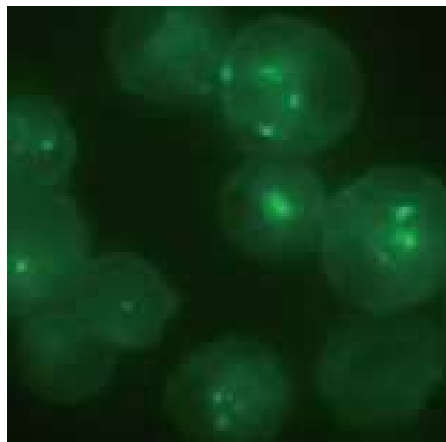


## TESIS DOCTORAL

**Inducción de autofagia por estrés en el  
retículo endoplasmático y por metales  
pesados en *Chlamydomonas reinhardtii* y su  
conexión con estrés oxidativo**



**Marta Pérez Martín**

**Inducción de autofagia por estrés en el  
retículo endoplasmático y por metales  
pesados en *Chlamydomonas reinhardtii* y su  
conexión con estrés oxidativo**

Trabajo presentado para optar al grado de Doctora  
en Ciencias Biológicas por la Licenciada

Marta Pérez Martín

Sevilla, Septiembre de 2015

**Director:**



Dr. José Luis Crespo González  
Científico Titular del Consejo  
Superior de Investigaciones  
Científicas

**Tutor:**



Dr. Francisco Javier Florencio  
Catedrático de Bioquímica y  
Biología Molecular

### **Tesis por compendio de publicaciones:**

Según el artículo 9 de la normativa reguladora del régimen de Tesis Doctoral (Acuerdo 9.1/CG 19-4-12) de la Universidad de Sevilla, se presenta para su evaluación como Tesis Doctoral un conjunto de dos artículos científicos publicados por la doctoranda Marta Pérez Martín en revistas indexadas en JCR (Journal Citation Reports).

## AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental presentado en esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis (IBVF), centro mixto del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y de la Universidad de Sevilla (US). Mi agradecimiento a estas instituciones y a sus técnicos por aportar los medios necesarios para el desempeño de este trabajo.

Quiero resaltar que esta Tesis no es sólo mía, ya que no hubiera sido posible sin la aportación directa o indirecta de muchas personas. Por ello, tengo que dar las gracias.

Gracias a José Luis Crespo, más conocido como “el Pepelu”, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por dirigir esta Tesis. Gracias también a Javier Florencio por ser mi tutor ante la Universidad de Sevilla. Gracias por todo lo que me habéis enseñado.

Gracias a todos los compañeros que he tenido a lo largo de estos años, que sin quererlo han participado en mis inicios en este mundillo... Gracias al L2-3, del que formé parte durante bastante tiempo... Gracias a Rocío, Anita, María José, Maribel, Luis, Joaquín, Rafa, Lorena, Carla, Sandra... Miguel, gracias por todas tus recetas y protocolos. Esther, gracias por enseñarme todas las cosillas cuando llegué al laboratorio. Gracias al L4, por acogerme siempre con los brazos abiertos. Gracias a Cristina, Ana, Elena y Espe por todas las comidas que hemos compartido y por las sobremesas... Rebeca, gracias por todas las conversaciones, por los consejos y por los ánimos. Gracias al L14 por dejarme un huequcito cuando el espacio apremiaba... Gracias también a todos los que me sonrieron cuando me los crucé por los pasillos.

Gracias a mi compañera y amiga Ascensión, conocida por todos como “Choni”. Gracias por aparecer con todo tu entusiasmo y tu ilusión, me has ayudado más de lo que crees... Gracias por esperarme para comer hasta cualquier hora, gracias por los tintos y las patatas, y por las reflexiones que siempre los acompañaban... Sobre todo gracias por estar a mi lado, por los momentos que hemos pasado juntas y también por los que pasaremos.

Gracias a mi familia, en especial a mis padres, ya que si hoy estoy aquí es en gran parte por ellos. Gracias por no dudar de mí en ningún momento, por estar siempre ahí y apoyarme en todo, aunque al principio no supierais lo qué era eso de una Tesis... Gracias por intentar animarme en los malos momentos y por alegraros incluso más que yo en los buenos. Gracias a Adam, el gato negro que me trajo suerte... Gracias también a todos los amigos que, estando cerca o lejos, han estado a mi lado.

Por último, quisiera dar las gracias a esta Tesis. Gracias por los buenos y por los malos momentos que me has hecho pasar. Más allá de cualquier título, gracias por todo lo que me has aportado tanto a nivel profesional como personal. Y, como no, gracias a la Chlamy por ser a veces tan complicada...



# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	<i>Chlamydomonas</i> como organismo modelo.....	1
1.1.1	Clasificación filogenética y distribución del género <i>Chlamydomonas</i> .....	1
1.1.2	Morfología de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	2
1.1.3	División celular de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	5
1.1.4	El ciclo de vida de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	5
1.1.5	Principales ventajas de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> para su uso en el laboratorio.....	8
1.2	Autofagia.....	13
1.2.1	Definición y tipos de autofagia.....	13
1.2.2	El proceso autofágico. ....	15
1.2.3	Detección de la autofagia.....	19
1.2.4	Funciones de la autofagia.....	23
1.3	Autofagia en organismos fotosintéticos.....	27
1.3.1	Autofagia en plantas.....	27
1.3.2	Autofagia en microalgas. ....	31
1.3.3	Detección de la autofagia en organismos fotosintéticos.....	32
1.3.4	Funciones de la autofagia en organismos fotosintéticos.....	35
1.4	Regulación de la autofagia.....	38
1.4.1	Vías de señalización.....	39
1.4.2	Mecanismos de regulación postraduccional.....	44
1.4.3	Regulación transcripcional y epigenética.....	45
1.4.4	Regulación de la autofagia por ROS. ....	46
1.5	Retículo endoplasmático. ....	50
1.5.1	Estrés en el retículo endoplasmático. ....	51
1.5.2	Conexión entre estrés en el retículo endoplasmático y estrés oxidativo.....	54
1.6	Metales pesados. ....	55
1.6.1	Toxicidad inducida por metales pesados. ....	55

1.6.2	Conexión entre toxicidad inducida por metales y estrés oxidativo. ....	57
2	OBJETIVOS .....	60
3	MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
3.1	Organismos y condiciones de cultivo. ....	61
3.1.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	61
3.1.2	<i>Escherichia coli</i> .....	62
3.2	Métodos de biología molecular. ....	63
3.2.1	Plásmidos y oligonucleótidos utilizados. ....	63
3.2.2	Aislamiento de ácidos nucleicos.....	65
3.2.3	Análisis de DNA.....	66
3.2.4	Análisis de RNA. ....	67
3.2.5	Introducción de DNA exógeno en organismos.....	70
3.3	Métodos bioquímicos. ....	71
3.3.1	Preparación de extractos celulares de <i>C. reinhardtii</i> . ....	71
3.3.2	Cuantificación de proteínas.....	71
3.3.3	Electroforesis unidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida..	71
3.3.4	Técnicas inmunológicas. ....	72
3.3.5	Cuantificación de glutatión oxidado y reducido.....	73
3.4	Ensayos celulares. ....	74
3.4.1	Determinación de la concentración celular en cámara de Neubauer. ....	74
3.4.2	Determinación de la viabilidad celular.....	74
4	COPIA DE LAS PUBLICACIONES.....	75
4.1	Oxidative Stress Contributes to Autophagy Induction in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> . ....	75
4.1.1	Material suplementario.....	88
4.2	Activation of Autophagy by Metals in <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	102
4.2.1	Material suplementario.....	113
5	RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	118
5.1	El estrés en el retículo endoplasmático activa la autofagia en <i>Chlamydomonas</i> . ....	118

5.2	El estrés en el retículo endoplasmático induce estrés oxidativo en Chlamydomonas. ....	119
5.3	El estrés oxidativo participa como inductor de la autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático en Chlamydomonas.....	120
5.4	La toxicidad inducida por metales pesados activa la autofagia en Chlamydomonas. ....	122
5.5	El exceso de Ni <sup>2+</sup> induce estrés oxidativo en Chlamydomonas. ....	123
5.6	El estrés oxidativo participa como inductor de la autofagia en respuesta a la toxicidad generada por Ni <sup>2+</sup> . ....	124
6	DISCUSIÓN.....	125
6.1	Inducción de autofagia por estrés en el retículo endoplasmático en Chlamydomonas. ....	125
6.2	Inducción de estrés oxidativo por estrés en el retículo endoplasmático en Chlamydomonas. ....	126
6.3	Estrés oxidativo como inductor de autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático. ....	127
6.4	Inducción de autofagia por metales pesados en Chlamydomonas.....	129
6.5	Inducción de estrés oxidativo por metales pesados en Chlamydomonas. ...	131
6.6	Estrés oxidativo como inductor de autofagia en respuesta a metales pesados... ..	131
6.7	Conexión entre estrés oxidativo y activación de autofagia en Chlamydomonas.. ....	133
7	CONCLUSIONES .....	135
8	BIBLIOGRAFÍA .....	136



# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Chlamydomonas* como organismo modelo.

*Chlamydomonas reinhardtii* es el organismo modelo usado en la presente Tesis Doctoral. Este alga verde unicelular se ha establecido como organismo eucariota fotosintético modelo de referencia. Las cepas de laboratorio usadas actualmente derivan probablemente de una muestra de suelo aislada por GM Smith en 1945 cerca de Amherst (Massachusetts, Estados Unidos) (Harris, 2001). A continuación se detallan sus características más importantes, así como las ventajas que le han llevado a convertirse en el organismo modelo que es hoy en día.

### 1.1.1 Clasificación filogenética y distribución del género *Chlamydomonas*.

El género *Chlamydomonas* engloba distintas algas unicelulares, caracterizadas por presentar dos flagelos anteriores, un cloroplasto que envuelve uno o más pirenoides, y pared celular (Harris, 2001; Harris et al., 2008). Las distintas especies dentro del género se han clasificado según sus características morfológicas (Harris, 2001).

Según la última clasificación taxonómica de los eucariotas, el género *Chlamydomonas* se encuentra dentro del grupo *Archaeplastida*, que comprende organismos con cloroplasto procedente de una endosimbiosis primaria con una cianobacteria (que es el caso de *Chlamydomonas*) así como organismos que han perdido este cloroplasto (Adl et al., 2005). Dentro de este grupo, *Chlamydomonas* se encuentra en el rango *Chloroplastida*, segundo rango *Chlorophyta* (Adl et al., 2005).

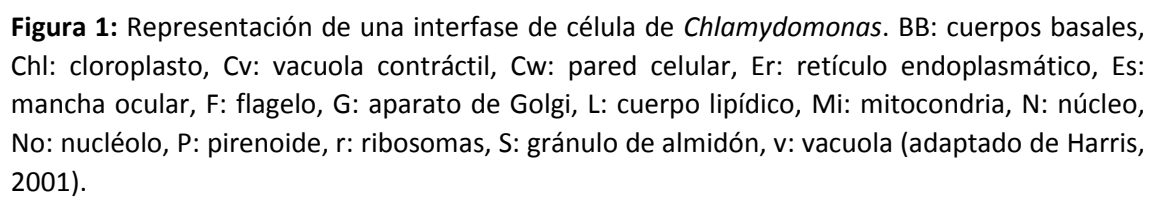
Las especies de *Chlamydomonas* se encuentran distribuidas por diversidad de hábitats a lo largo de todo el planeta, pudiendo vivir incluso en condiciones extremas. Algunas especies habitan ambientes extremadamente ácidos, como pueden ser pantanos o lagos ácidos, cráteres volcánicos, manantiales de azufre o aguas contaminadas por la minería (Harris et al., 2008). Por ejemplo, se han encontrado especies de *Chlamydomonas* en Río Tinto (Huelva), que es extremadamente ácido y presenta elevadas concentraciones de metales pesados (Aguilera and Amils, 2005). Por otro lado, también se conocen especies halotolerantes de *Chlamydomonas*, que habitan en ecosistemas marinos (Harris et al., 2008).

Otras especies de *Chlamydomonas* viven a temperaturas extremas. Por ejemplo, se han descubierto especies de *Chlamydomonas* en la Antártida, que sobreviven gracias a la secreción de proteínas IBP (Ice-Binding Proteins) que modifican la estructura del hielo y permiten la supervivencia celular (Raymond and Morgan-Kiss, 2013). Además,

se conocen especies que han dado lugar a las llamadas “nieve roja” y “nieve verde”, por dar estos colores a la nieve de algunos hábitats del hemisferio norte (Harris et al., 2008).

### **1.1.2 Morfología de *Chlamydomonas reinhardtii*.**

Las células de *Chlamydomonas reinhardtii* (Figura 1) presentan una forma ovalada con una longitud aproximada de 10  $\mu\text{m}$  y se encuentran envueltas por una pared celular, compuesta básicamente de glicoproteínas y no de celulosa como se ha publicado erróneamente en alguna ocasión (Harris et al., 2008). En la parte central de las células, encontramos un núcleo de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro con un nucléolo prominente. La membrana del núcleo se encuentra unida a la del retículo endoplasmático, cerca del cual se sitúa el aparato de Golgi. En esta zona de la célula, encontramos también el lisosoma (Harris, 2001; Harris et al., 2008).



Distribuidas por el citoplasma se encuentran las mitocondrias, que suelen presentar forma alargada y que ocupan una parte muy pequeña del volumen celular (Eriksson et al., 1995). Por otro lado, se encuentra un único gran cloroplasto en la zona basal de las células. El cloroplasto presenta forma de copa y se encuentra rodeando el núcleo, ocupando aproximadamente dos tercios del volumen celular. La membrana tilacoidal forma vesículas delgadas o discos, que pueden organizarse en agrupamientos de 2 a 10 discos o permanecer aislados (Harris, 2001; Harris et al., 2008).

Dentro de la parte central del cloroplasto encontramos el pirenoide, orgánulo en el que se lleva a cabo la fijación de dióxido de carbono y que se compone básicamente de Rubisco (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa). Suelen encontrarse gránulos de almidón envolviendo el pirenoide (Harris, 2001).

En la parte anterior de las células se encuentran dos vacuolas contráctiles, con función osmoreguladora. Estas vacuolas especializadas son de gran importancia en la regulación del flujo celular de agua (Kosmic-Buchmann et al., 2014). Cuando las células se encuentran en un medio hipotónico, las vacuolas contráctiles eliminan el exceso de agua absorbida, evitando que las células lleguen a explotar (Luykx et al., 1997).

En la zona apical de las células encontramos también dos flagelos, de una longitud de entre 10 y 12  $\mu\text{m}$ . Estos flagelos, compuestos por más de 250 proteínas, emergen a través de la pared celular por unas estructuras especializadas en forma de collar (Mitchell, 2000). Los flagelos nacen de un par de cuerpos basales, localizados justo en el extremo anterior de la célula. Estos cuerpos basales se encuentran conectados el uno al otro a través de una fibra estriada, además en su extremo proximal se encuentran unidos a cuatro grupos de microtúbulos que se extienden por la parte anterior de la célula. Por último, los cuerpos basales se encuentran conectados al núcleo a través de fibras proximales (Harris, 2001; Harris et al., 2008).

Finalmente, en el ecuador celular y dentro de uno de los extremos del cloroplasto, se encuentra la mancha ocular o “eyespot”. La mancha ocular está formada por dos o más capas de gránulos de pigmentos carotenoides, por lo que suele visualizarse al microscopio como un punto de color anaranjado. Estos pigmentos dirigen la luz a un fotoreceptor que se encuentra en la membrana plasmática adyacente a la mancha ocular. Por otro lado, la mancha ocular se encuentra asociada a las raíces de los microtúbulos de los flagelos, lo que implica una conexión funcional entre la fotorecepción y la movilidad celular. En conjunto, la mancha ocular permite a las células orientarse según la luz, por lo que se le considera un aparato visual primitivo (Harris, 2001; Harris et al., 2008).



### **1.1.3 División celular de *Chlamydomonas reinhardtii*.**

*Chlamydomonas* puede reproducirse de forma asexual o sexual. La reproducción asexual consiste en la división mitótica de las células, que se da siempre que las circunstancias son favorables para ello. Al inicio de la mitosis, desaparece el nucléolo y el núcleo cambia de posición, situándose cerca de la membrana plasmática (Harris et al., 2008).

Durante la mitosis, los cuerpos basales asumen el papel de centriolos. Así, se pierde la conexión entre los cuerpos basales y los flagelos, que son absorbidos por la célula. Se forma el huso mitótico, los microtúbulos se dirigen hacia los polos celulares y aparece un anillo contráctil de actina que envuelve el huso (COSS, 1974).

Posteriormente los cuerpos basales se duplican, situándose un par en cada extremo del huso mitótico. Cada par estará formado por un cuerpo basal nuevo y por otro antiguo (Huang et al., 1982). El núcleo empieza a elongarse y los cromosomas se mueven hacia sus respectivos polos (Harris et al., 2008).

Finalmente se da la división y los cuerpos basales vuelven al extremo anterior de la célula, donde se forman nuevos flagelos. El cloroplasto se divide al darse la citocinesis, separándose en dos partes aproximadamente iguales. Además, se piensa que cada parte de cloroplasto hereda un número de copias parecido del genoma cloroplástico. Dentro del núcleo de las células hijas, aparece de nuevo el nucléolo. En muchas ocasiones, ocurren dos ciclos de mitosis seguidos dentro de la pared celular de una única célula madre, que al degradarse libera cuatro células hijas (Harris, 2001; Harris et al., 2008).

Por otro lado, la meiosis se da en las zigosporas de *Chlamydomonas* durante su ciclo de vida sexual. Las zigosporas son células diploides producto de la unión de dos células haploides, con una pared gruesa que les permite resistir condiciones adversas. Debido a las características de esta pared, la visualización del proceso de meiosis en *Chlamydomonas* ha sido muy escasa. No obstante, se cree que los estados de metafase, anafase y telofase de meiosis I y II son similares a los respectivos estados de mitosis, asumiendo también los cuerpos basales el papel de centriolos (Harris et al., 2008).

### **1.1.4 El ciclo de vida de *Chlamydomonas reinhardtii*.**

*Chlamydomonas* es un alga fotosintética, que puede vivir tanto de forma autótrofa como heterótrofa. Es decir, puede crecer fotosintéticamente gracias a la luz y al dióxido de carbono atmosférico, o bien puede usar acetato como fuente de carbono, lo cual representa una gran ventaja ya que permite el crecimiento en oscuridad.

Además, *Chlamydomonas* puede crecer en medio líquido o sólido a pH neutro, y no presenta requerimientos especiales (Harris, 2001).

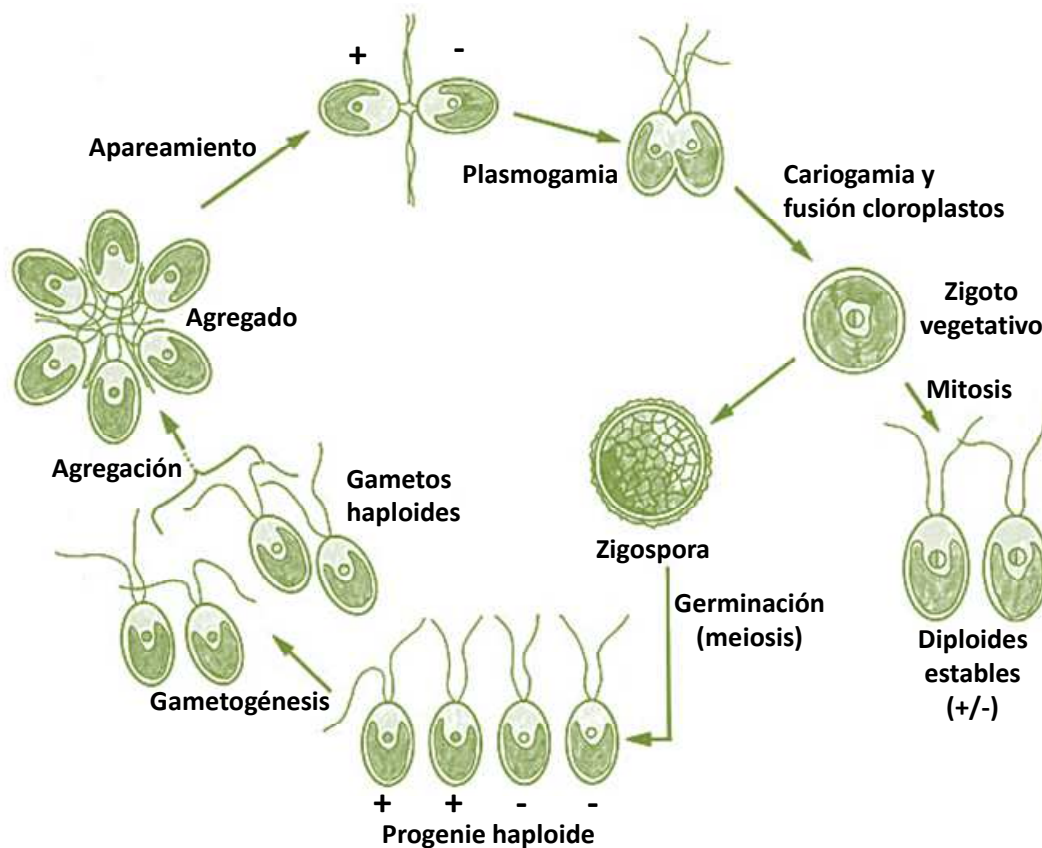
Cuando el crecimiento se realiza en luz continua (con o sin acetato), es siempre más rápido que en oscuridad, obteniendo un tiempo medio de división de entre 6 y 8 horas (Harris, 2001). Esto es debido a que en presencia de luz realiza la fotosíntesis además de poder obtener energía del acetato, mientras que en oscuridad su única fuente de energía es el acetato. Por otro lado, cuando se realiza el cultivo en ciclos de luz-oscuridad, las células de *C. reinhardtii* sincronizan su crecimiento permaneciendo en fase G1 durante el período de luz y dividiéndose durante el período de oscuridad, dependiendo el número de divisiones del tamaño celular alcanzado durante el período de luz (Harris, 2001; Harris et al., 2008).

Cabe resaltar el control de los ciclos ambientales en las células de *Chlamydomonas*, comúnmente conocido como reloj circadiano. En el genoma de *Chlamydomonas* se han encontrado multitud de genes relacionados con los ciclos circadianos en otros organismos (Mittag et al., 2005). Así, cuando las células viven en su entorno natural, la fototaxis ocurre mayoritariamente durante las horas de luz, el contenido en almidón es máximo en medio de la fase de oscuridad y la asimilación de nitrógeno se maximiza al final de la fase de oscuridad. Todos estos procesos continúan cuando las células se cultivan de forma artificial en luz constante, pero en la naturaleza se encuentran estrictamente regulados por los ciclos ambientales (Harris et al., 2008).

Por último, el ciclo de vida de *Chlamydomonas* incluye su ciclo de reproducción sexual (Figura 2). Las células son normalmente haploides, y pueden pertenecer a dos tipos distintos de genotipos de apareamiento o “mating type”: + o -. Estos genotipos están determinados por un único locus en el genoma, distinto para cada tipo celular (Ferris et al., 2002). Los dos tipos celulares resultantes son similares morfológicamente, aunque pueden presentar ciertas diferencias a nivel ultra-estructural (Harris et al., 2008).

Cuando se encuentran en condiciones adversas, los dos tipos celulares pueden diferenciarse en gametos sexualmente competentes, siendo la deficiencia de nitrógeno el inductor más potente de la gametogénesis. Para que tenga lugar la gametogénesis es además necesaria la presencia de luz (Beck and Acker, 1992). Por otro lado, es conocido que distintos genes se encargan de llevar a cabo la gametogénesis en cada genotipo de apareamiento, además cada tipo celular desarrolla estructuras de apareamiento diferentes (Harris et al., 2008).

Una vez competentes, los gametos de tipo + se aparean con los gametos de tipo - a través de los flagelos, en una reacción mediada por aglutininas específicas (Hunnicut et al., 1990). Cada gameto puede unirse a más de un gameto del tipo contrario a través de los flagelos, por lo que se forman grupos de células unidas conocidos como agregados (Harris, 2001; Harris et al., 2008).



**Figura 2:** Ciclo de reproducción sexual en *Chlamydomonas reinhardtii*. Adaptado de Harris et al., 2008.

Después del apareamiento, los flagelos sufren cambios morfológicos, se activan las estructuras de apareamiento y las paredes celulares se disuelven mediante enzimas líticas. Las dos células se fusionan (plasmogamia) a través de las estructuras de apareamiento, dando lugar a un cigoto diploide móvil con cuatro flagelos. Una vez fusionadas las células, se fusionan los núcleos (cariogamia) y posteriormente los cloroplastos (Harris et al., 2008).

Finalmente, los flagelos así como los cuerpos basales y toda la maquinaria asociada desaparecen. Entonces se sintetiza la pared, que es impermeable y está formada por glicoproteínas y material fibroso, dando lugar a la zigospora. En la zigospora, los cloroplastos se fusionan y se acumulan cuerpos lipídicos (Baldan et al., 1991). Las zigosporas son formas resistentes, que pueden permanecer viables en la naturaleza durante años (Harris et al., 2008).

Por último, cuando vuelve a haber disponibilidad de nitrógeno en el medio, ocurre la meiosis de las zigosporas como se ha comentado en el apartado anterior, dando lugar de nuevo a células haploides (Harris, 2001).

No obstante, entre el 1 y el 5 % de los gametos fusionados no da lugar a zigosporas, sino a células diploides que se reproducen de forma vegetativa mediante mitosis. Estas

células pueden diferenciarse claramente gracias a que empiezan a dividirse rápidamente después de la fusión de los gametos, por lo que al sembrar una mezcla de apareamiento son las primeras colonias en aparecer. También pueden diferenciarse mediante marcadores auxótrofos. Se desconoce si este tipo de células diploides puede tener alguna utilidad para *Chlamydomonas*, ya que son células incapaces de producir zigosporas e incapaces de aparearse las unas con las otras, por presentar el genotipo de apareamiento - que actúa como dominante a nivel fenotípico (Ebersold, 1967).

#### **1.1.5 Principales ventajas de *Chlamydomonas reinhardtii* para su uso en el laboratorio.**

*Chlamydomonas* se considera una forma de vida primitiva de gran relevancia evolutiva, ya que se cree que es similar a la célula eucariota ancestral. Su linaje se separó del de las plantas terrestres hace aproximadamente mil millones de años, después de haberse separado del linaje que dio lugar a animales y hongos. La secuenciación del genoma de *Chlamydomonas* ha confirmado su significancia evolutiva. Así, *Chlamydomonas* comparte genes con animales (genes que se perdieron en el linaje de las plantas), sobretodo genes relacionados con los flagelos y los cuerpos basales (Merchant et al., 2007).

Además de su relevancia, que convierte a *Chlamydomonas* en un modelo de gran utilidad, esta microalga presenta importantes ventajas para su uso en el laboratorio. Tanto es así que se le ha llegado a denominar la “levadura verde” (Goodenough, 1992), comparándola con la levadura como modelo de célula eucariota en general.

##### **1.1.5.1 Ciclo de vida y crecimiento.**

*Chlamydomonas* presenta un ciclo de vida simple y puede cultivarse fácilmente en el laboratorio, tanto en medio mínimo como en medio enriquecido con acetato, como ya se ha comentado anteriormente. La capacidad de crecer con acetato como fuente de carbono le permite crecer en oscuridad. A diferencia de lo que ocurre en plantas, *Chlamydomonas* es capaz de sintetizar y ensamblar un cloroplasto funcional en oscuridad, lo que convierte a este organismo en un excelente modelo para el estudio de la fotosíntesis (Rochaix, 2001). Hoy en día, existen multitud de mutantes de fotosíntesis y de biogénesis y regulación del cloroplasto disponibles en *C. reinhardtii* (<http://chlamycollection.org/>), que se ha convertido en uno de los principales organismos modelo fotosintéticos.

### **1.1.5.2 Herramientas moleculares.**

Se han descrito una serie de herramientas moleculares que facilitan el uso de *Chlamydomonas* en el laboratorio y la convierten en un organismo modelo versátil. Sus tres genomas, mitocondrial, cloroplástico y nuclear, se encuentran secuenciados y anotados (Maul, 2002; Merchant et al., 2007; Vahrenholz et al., 1993), y la transformación tanto del núcleo como del cloroplasto y de la mitocondria se puede realizar hoy en día de forma sencilla (Harris, 2001).

#### **1.1.5.2.1 Transformación del núcleo de *Chlamydomonas*.**

La transformación nuclear de *Chlamydomonas* puede llevarse a cabo mediante distintas técnicas, aunque las principales son la agitación en presencia de perlas de vidrio (Kindle, 1990) y la electroporación (Shimogawara et al., 1998). La más sencilla es la agitación vigorosa de las células con perlas de vidrio junto con el ADN transformante, cuya principal ventaja es que no requiere equipamiento especializado. No obstante, hay que tener en cuenta que se requiere disolver la pared celular previamente a la transformación, o bien usar mutantes de pared celular (KINDLE, 1990). La electroporación presenta una eficiencia de hasta dos órdenes de magnitud superior a la obtenida por agitación con perlas de vidrio (Shimogawara et al., 1998). En este caso, no es necesario eliminar la pared celular aunque hacerlo aumenta la eficiencia.

Recientemente, se han desarrollado más técnicas de transformación que presentan una elevada eficiencia, como el uso de nanopartículas cargadas positivamente (Kim et al., 2014) o la transformación mediada por *Agrobacterium* (Pratheesh et al., 2014). Por tanto, el abanico de herramientas moleculares disponibles para *Chlamydomonas* sigue en continuo crecimiento.

Como inconveniente, cabe destacar que la transformación nuclear ocurre por inserción al azar del ADN exógeno en el genoma, ya que el núcleo presenta una recombinación homóloga muy ineficiente o prácticamente inexistente (Sodeinde and Kindle, 1993), lo que dificulta las tareas de silenciamiento génico. Además, esta inserción al azar provoca en ocasiones la delección de fragmentos de ADN endógenos (Lefebvre and Silflow, 1999).

No obstante, las técnicas de RNA interferente o RNAi se encuentran bastante desarrolladas en *Chlamydomonas* y permiten el silenciamiento de genes específicos (Jinkerson and Jonikas, 2015; Kim and Cerutti, 2009; Schroda, 2006). Por otro lado, esta inserción al azar que ocurre en el núcleo de *Chlamydomonas* puede utilizarse como herramienta para realizar mutagénesis insercional (Tam and Lefebvre, 1995).

Existen distintos promotores y genes de resistencia a antibióticos disponibles para transformar *Chlamydomonas reinhardtii*. Los promotores más utilizados son los de los genes *PsaD*, *RbcS2* y *HSP70A*. Estos genes tienen niveles de transcripción elevados, por lo que sus promotores proporcionan buenos resultados de expresión.

El gen *PsaD* codifica para una subunidad del Fotosistema I, que al presentar una elevada tasa de renovación requiere una elevada expresión del gen. La característica más importante del gen *PsaD* es que no presenta intrones, lo que significa que todas las secuencias reguladoras necesarias para su elevada expresión se encuentran en el promotor (Fischer and Rochaix, 2001).

El gen *RbcS2* codifica una de las subunidades pequeñas de la Rubisco, considerada la proteína más abundante en la Tierra, y cuyo promotor ha sido ampliamente utilizado para proporcionar niveles de expresión elevados en *Chlamydomonas*. Al contrario que el gen *PsaD*, el gen *RbcS2* sí presenta intrones involucrados en su expresión, y se ha comprobado que la inserción de su primer intrón en un gen marcador aumenta la expresión de forma significativa (Fischer and Rochaix, 2001).

Por último, el gen *HSP70A* codifica para una chaperona de elevada expresión. Este promotor presenta una expresión constitutiva, inducible además por calor y por luz (Schroda et al., 2000). Funciona como activador transcripcional cuando se sitúa delante de otros promotores, ya que actúa disminuyendo la probabilidad de que el transgen se silencie transcripcionalmente (Schroda et al., 2002).

Además de estos promotores, también se ha utilizado el promotor del gen de la nitrato reductasa *Nit1* (Koblenz and Lechtreck, 2005), que es un promotor regulable que se induce cuando las células se encuentran en limitación de amonio (Fernandez et al., 1989). Por otro lado, el gen *Nit1* puede utilizarse como marcador de selección al complementar mediante co-transformación con genes no seleccionables la estirpe *nit1* de *Chlamydomonas* (Kindle et al., 1989).

Los problemas de expresión génica que en ocasiones se presentan en *Chlamydomonas* suelen asociarse a la inserción en zonas silenciadas del genoma o al uso de codón (Harris et al., 2008). Esta microalga presenta un genoma con un alto contenido en G+C, de en torno al 60% (Merchant et al., 2007), lo que dificulta la expresión de genes con menor proporción de G+C, aunque esto puede solventarse adaptando el uso de codón de los genes a expresar.

En cuanto a genes de resistencia, cabe destacar el gen *ble* y el gen *AphVIII* (Harris, 2001). El gen *ble* proviene de *Streptoalloteichus hindustanus* y confiere resistencia a Bleomicina (Stevens et al., 1996). Por su parte, el gen *AphVIII* proviene de *Streptomyces rimosus*, presenta un uso de codón similar al de *Chlamydomonas*, y confiere resistencia a antibióticos aminoglucósidos como la Paramomicina, la Kanamicina y la Neomicina (Sizova et al., 2001). También existen mutantes auxótrofos de arginina en *Chlamydomonas* que permiten la clonación de genes por complementación (Debuchy et al., 1989).

Por otro lado, existen herramientas para analizar la expresión génica, como la fusión de promotores al gen *Ars1*, y su transformación en una estirpe mutante para este gen. *Ars1* codifica una arilsulfatasa que reacciona con un sustrato cromogénico que puede ser fácilmente detectado mediante espectrofotometría o visualmente (Ohresser et al., 1997).

#### **1.1.5.2.2 Transformación del cloroplasto de *Chlamydomonas*.**

En cuanto a la transformación del cloroplasto, el método más eficiente es el bombardeo de las células con micropartículas de oro o tungsteno cubiertas con el ADN transformante (Purton, 2007). A diferencia del núcleo, el ADN se inserta en el genoma del cloroplasto por recombinación homóloga. El marcador de selección más usado en el cloroplasto es el gen *aadA* (aminoglucósido adenil transferasa), que confiere resistencia a Espectinomicina y Estreptomicina (Ramesh et al., 2011).

El cloroplasto de *Chlamydomonas* ha mostrado facilidad para expresar proteínas exógenas, de hecho se ha demostrado que puede plegar, ensamblar y modificar correctamente proteínas de mamífero. Esto ha hecho que el cloroplasto de *Chlamydomonas* llegue a considerarse una “fábrica de proteínas” para distintas finalidades. Como ventajas, está el alto rendimiento de expresión del cloroplasto, el poco tiempo requerido para obtener grandes cantidades de proteína, y el hecho de que las microalgas como *Chlamydomonas* se consideren organismos seguros por no contener endotoxinas ni virus o priones humanos (Mayfield et al., 2007).

#### **1.1.5.2.3 Transformación mitocondrial de *Chlamydomonas*.**

Por último, *Chlamydomonas* se ha convertido en el segundo organismo modelo al cual se le puede transformar la mitocondria, después de *Saccharomyces cerevisiae*. Para llevar a cabo la transformación, se utiliza un método biolístico, en el que se disparan a las células partículas de tungsteno con el ADN transformante, obteniendo una elevada eficiencia. La creación de mutantes mitocondriales ha permitido estudiar la biogénesis de la mitocondria y del Complejo I, lo cual es de gran interés ya que *Saccharomyces cerevisiae* carece de este complejo (Remacle et al., 2006).

### 1.1.5.3 Interés científico y biotecnológico de *Chlamydomonas* como sistema modelo.

Gracias a todas las herramientas desarrolladas en *Chlamydomonas* que se han explicado anteriormente, esta microalga ha servido de modelo para diversidad de estudios desde la caracterización del mecanismo de concentración de carbono o CCM ("Carbon Concentrating Mechanism") presente en los organismos fotosintéticos acuáticos (Spalding, 2008) o del ritmo circadiano (Mittag et al., 2005), hasta la homeostasis y tolerancia a metales pesados (Hanikenne, 2003), la mancha ocular (Kreimer, 2009) y la biosíntesis de amilopectina (Buléon et al., 1997), entre otros muchos.

Además, *Chlamydomonas* también ha sido, y es en la actualidad, empleada con fines biotecnológicos (Scaife et al., 2015). Recientemente, las microalgas han adquirido un papel relevante como organismo productor de biocombustibles (Ho et al., 2014), por su elevado contenido en lípidos, por su rápido crecimiento y por su mayor eficiencia en la síntesis de lípidos en comparación con las plantas superiores (Chisti, 2007). *Chlamydomonas* se usa como modelo de referencia para conocer y mejorar los procesos relacionados con la síntesis de triacilglicerol (Karpagam et al., 2015; Merchant et al., 2012; Siaut et al., 2011), a partir de los cuales se genera el biodiesel. Se han identificado en *Chlamydomonas* algunos de los genes más importantes en la síntesis de triacilglicerol (La Russa et al., 2012), se ha caracterizado el proteoma de los cuerpos lipídicos (Nguyen et al., 2011) y se han identificado las vías reguladoras del metabolismo lipídico (Gargouri et al., 2015). Todos estos estudios han servido y servirán para mejorar la producción de biodiesel a partir de microalgas (Valledor et al., 2014).

En conclusión, las ventajas que presenta *Chlamydomonas* así como las herramientas disponibles para trabajar con esta microalga han hecho que se convierta en un importante sistema modelo para organismos fotosintéticos, en el que se estudian multitud y diversidad de procesos celulares.



## 1.2 Autofagia.

Esta tesis doctoral se ha centrado en gran medida en el estudio de la autofagia en *Chlamydomonas*. A continuación se detalla el funcionamiento así como las características más importantes de este proceso catabólico, que es de gran importancia para la respuesta y adaptación a distintos tipos de estrés en eucariotas.

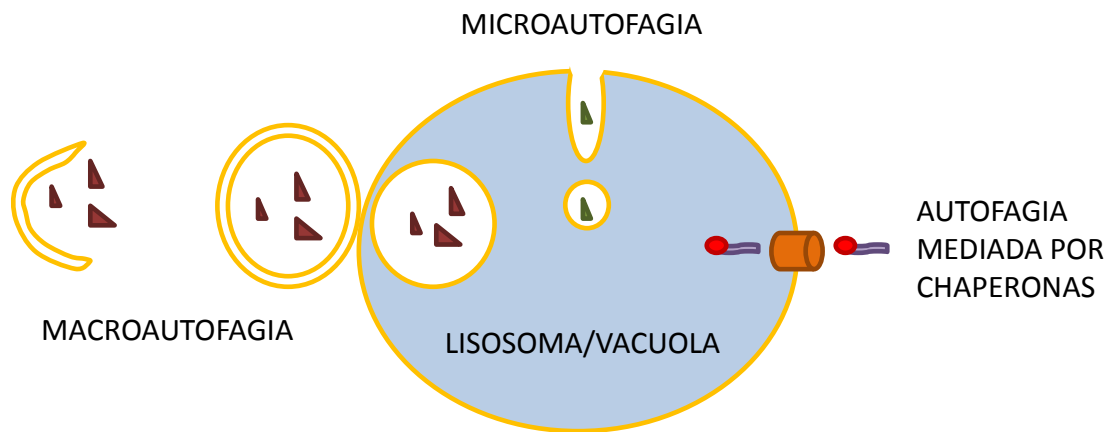
### 1.2.1 Definición y tipos de autofagia.

La palabra autofagia deriva del griego “auto” (a uno mismo) y “fagia” (comer) (Levine and Klionsky, 2004). La autofagia es un proceso esencial altamente conservado en eucariotas, desde levaduras hasta plantas y mamíferos, mediante el cual la célula es capaz de reciclar parte de su material interno para responder a situaciones de estrés o bien para llevar a cabo procesos de desarrollo y diferenciación celular, así como para mantener la homeostasis celular (Mizushima, 2007). De forma general, puede decirse que la autofagia es el proceso que envía material intracelular al lisosoma o vacuola de la célula, donde ocurre su degradación para poder ser reutilizado posteriormente.

Existen tres tipos distintos de autofagia: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas o CMA (Chaperone Mediated Autophagy) (Mizushima, 2007). En la macroautofagia el material es dirigido a la vacuola/lisosoma a través de unas vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, donde se producirá la degradación del material (Glick et al., 2010).

En la microautofagia, es la vacuola/lisosoma la que engloba directamente material citoplasmático por invaginación de su propia membrana (Levine and Klionsky, 2004). Estas invaginaciones están altamente especializadas y se conocen como tubos autofágicos, debido a su forma de tubo (Uttenweiler and Mayer, 2008). Los tubos autofágicos median el proceso de microautofagia, ya que dirigen tanto la invaginación como la escisión de las vesículas al lumen lisosomal (Li et al., 2012).

En la autofagia mediada por chaperonas o CMA (Chaperone Mediated Autophagy), que sólo se da en mamíferos, las proteínas marcadas con chaperonas específicas son reconocidas por receptores de la membrana lisosomal, resultando en la translocación al lisosoma de dichas proteínas y en su degradación (Glick et al., 2010). Las proteínas que se degradan mediante este sistema presentan una secuencia consenso, que es la que reconocen las chaperonas encargadas de mediar su translocación al lisosoma (Dobrenel et al., 2011). Se ha demostrado que la macroautofagia y la CMA están interconectadas, de forma que cuando uno de los dos mecanismos se ve comprometido el otro se activa (Wu et al., 2014).



**Figura 3:** Representación de los tres tipos de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). Para más detalles ver texto.

Por último, dentro de la macroautofagia y de la microautofagia podemos distinguir entre autofagia selectiva y no selectiva. La CMA es siempre un proceso selectivo. Mientras que en la autofagia no selectiva se degradan porciones de citoplasma al azar, en la autofagia selectiva son moléculas, proteínas o incluso orgánulos específicos los que se degradan para responder a determinadas situaciones (Glick et al., 2010). La autofagia selectiva constituye un mecanismo de control de calidad en las células, que requiere receptores específicos que reconocen el material a degradar (Stolz et al., 2014).

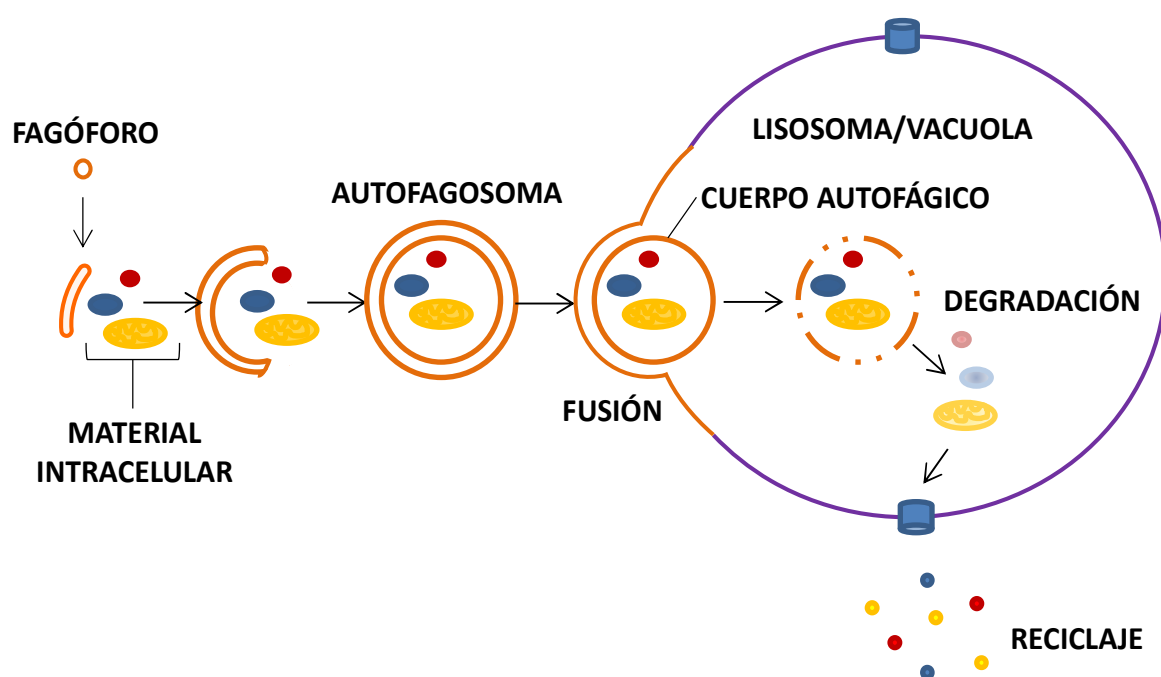
La vía Cvt (Cytoplasm to vacuole targeting) de levaduras constituye un buen ejemplo de autofagia selectiva. Mediante esta vía, la proteína Aminopeptidasa I es enviada a la vacuola de las células, donde ejerce su función como hidrolasa vacuolar. Los precursores de esta proteína forman oligómeros en el citoplasma, que son reconocidos y enviados a la vacuola a través de vesículas Cvt (similares a los autofagosomas). Cuando estas vesículas se fusionan a la vacuola, se liberan al interior los precursores de Aminopeptidasa I, que maduran gracias a las proteasas vacuolares generando su forma activa. La vía Cvt constituye la única forma biosintética de autofagia (Klionsky, 2007; Lynch-Day and Klionsky, 2010).

Otros ejemplos de autofagia selectiva son: la degradación de agregados proteicos mediante autofagia (Lamark and Johansen, 2012), la reticulofagia o degradación autofágica del retículo endoplasmático (Schuck et al., 2014), la mitofagia o degradación mitocondrial que se da por pérdida del potencial de membrana o de la integridad del orgánulo (Redmann et al., 2014), la pexofagia o degradación de peroxisomas que se da en levaduras (Sakai et al., 2006) así como en plantas (Avin-Wittenberg and Fernie, 2014; Lee et al., 2014) y en mamíferos (Nordgren et al., 2013; Oku and Sakai, 2010), la ribofagia o degradación de los ribosomas (Cebollero et al., 2012), y la xenofagia o degradación de patógenos intracelulares como parte de la inmunidad innata (Knodler and Celli, 2011).

De entre todos los tipos de autofagia, la macroautofagia es el tipo de autofagia predominante (Feng et al., 2014), el más caracterizado (Lynch-Day and Klionsky, 2010), y el único estudiado en la presente Tesis Doctoral. Por ello, y con el objetivo de simplificar, de ahora en adelante me referiré a la macroautofagia como autofagia.

### 1.2.2 El proceso autofágico.

La autofagia es un proceso continuo que puede dividirse en distintas etapas: inducción, expansión vesicular y formación del autofagosoma, direccionamiento del autofagosoma al lisosoma/vacuola, fusión del autofagosoma al lisosoma/vacuola, degradación y reciclaje del material (Levine and Klionsky, 2004).



**Figura 4:** Representación del proceso de autofagia, desde la expansión del fagóforo hasta la degradación y reciclaje del material.

Todo este proceso está orquestado por los denominados genes *ATG* y sus respectivas proteínas *ATG* (Autophagy related), que se denominan, generalmente, con un número correspondiente a su orden de descubrimiento (Klionsky et al., 2003). Los genes *ATG* fueron identificados inicialmente en *Saccharomyces cerevisiae* gracias a una búsqueda de mutantes deficientes en autofagia (Tsukada and Ohsumi, 1993). Se han identificado alrededor de 40 genes *ATG* en levaduras (Klionsky, 2014; Mochida et al., 2015), la mayoría de los cuales se encuentran conservados en eucariotas superiores. De estos genes, alrededor de 18 están implicados en la formación del autofagosoma y se les

conoce como maquinaria central de la autofagia o “core autophagy machinery” (Feng et al., 2014).

#### **1.2.2.1 Formación del autofagosoma.**

Cuando la autofagia es inducida, ya sea por algún tipo de estrés o por necesidades propias de la célula, se activa la formación de un autofagosoma alrededor del material a degradar. El autofagosoma se forma a partir una pequeña vesícula denominada membrana de aislamiento o fagóforo, que es un pequeño orgánulo parecido a una cisterna de Golgi (Mizushima, 2007). La proteína ATG1 (la primera proteína ATG identificada) es necesaria para la formación del fagóforo en levaduras, y forma un complejo con las proteínas ATG13, ATG17, ATG29 y ATG31 (Glick et al., 2010).

ATG1 es una Ser/Thr quinasa, cuya actividad está principalmente regulada por ATG13, de forma que cuando ATG13 se encuentra defosforilada se asocia con ATG1 e induce su actividad quinasa (Feng et al., 2014; Nakatogawa et al., 2009). No se conocen los sustratos de ATG1, pero se sabe que su actividad es esencial para la autofagia y se requiere para la formación del fagóforo y del autofagosoma, por lo que se considera que el complejo ATG1 regula la magnitud de la autofagia (Feng et al., 2014; Nakatogawa et al., 2009). El homólogo del complejo ATG1 en mamíferos es el complejo ULK1 (Feng et al., 2014).

Se piensa que ATG1 regula la acumulación en el fagóforo de la proteína transmembrana ATG9, que a su vez actúa promoviendo el reclutamiento de lípidos de membrana gracias a los cuales el fagóforo puede expandirse (Glick et al., 2010). No está claro cuál es el origen de la membrana que sirve para expandir el fagóforo, pero se cree que puede provenir de distintas fuentes intracelulares en las que también se encuentra ATG9 (Feng et al., 2014). La membrana del fagóforo se expande esféricamente, gracias a procesos de fusión homotípica mediados por proteínas SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptor) (Stroupe, 2011). Así, la membrana del fagóforo crece hasta fusionarse consigo misma, formando una vesícula de doble membrana: el autofagosoma (Nakatogawa et al., 2009).

En levaduras, se ha identificado una estructura que concentra la maquinaria central de la autofagia, situada en una región perivacuolar (Klionsky, 2007). En esta estructura, denominada PAS (Phagophore Assembly Site), es donde se inicia la formación del fagóforo (Feng et al., 2014). La proteína ATG17 ha demostrado ser clave para la estructura del PAS, actuando a modo de andamio para otras proteínas ATG (Mizushima, 2007). ATG1 también se localiza en el PAS (Feng et al., 2014), donde probablemente actúa fosforilando a una o a algunas de las proteínas ATG presentes en esta estructura (Nakatogawa et al., 2009).

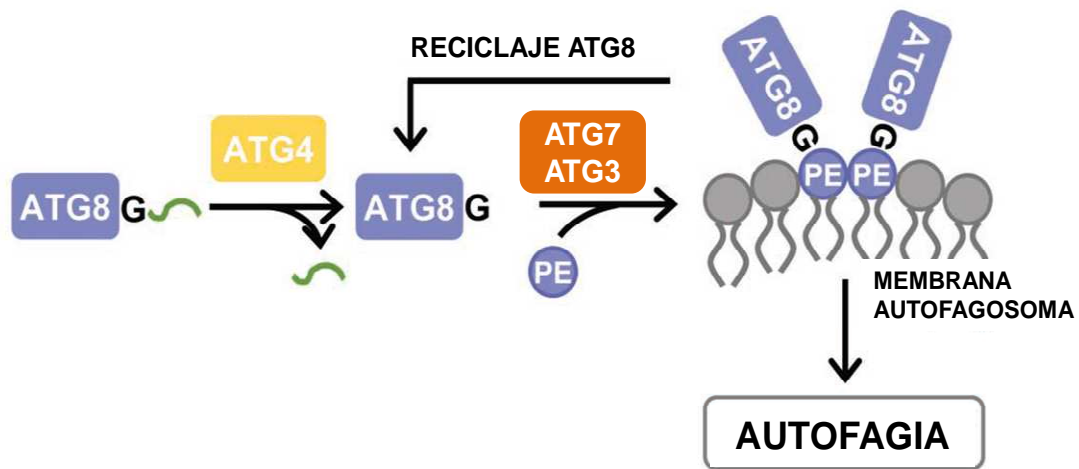
El complejo PtdIns3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) es esencial para la autofagia, y en levaduras se localiza en el PAS (Nakatogawa et al., 2009). Este complejo, formado por Vps15 (Vesicular protein sorting), Vps30 o ATG6, Vps34, ATG14 y ATG38, fosforila la posición D3 del anillo inositol del fosfatidilinositol para producir fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P). Se cree que el PtdIns3P sirve para reclutar otras proteínas al PAS, ya que proteínas como ATG18 se unen al PtdIns3P (Feng et al., 2014). En mamíferos existe un complejo PtdIns3K análogo (en el que también participa la proteína Beclin-1), implicado en reclutar proteínas ATG en el fagóforo así como en su elongación (Glick et al., 2010).

El PAS no ha sido identificado en ningún otro organismo, de hecho se ha propuesto que sólo las células de levadura presentan un PAS estable porque esta estructura se comparte con la vía Cvt (sólo presente en levaduras) (Mizushima, 2007). No obstante, en mamíferos se han identificado unas estructuras en forma de copa que sirven de plataforma para la biogénesis de los autofagosomas. Estas estructuras se denominan omegasomas, y son protrusiones del retículo endoplasmático (Simonsen and Stenmark, 2008).

#### **1.2.2.1.1 Sistemas de conjugación tipo ubiquitina ATG8 y ATG12.**

Dentro de las proteínas que participan en la formación del autofagosoma, cabe destacar los sistemas de conjugación tipo ubiquitina de ATG8 y de ATG12 (Levine and Klionsky, 2004), que se encuentran conservados desde levaduras hasta humanos (Yang and Klionsky, 2009). En el primero, ATG8 se conjuga al lípido de membrana fosfatidiletanolamina (PE), gracias a la acción de ATG4, ATG7 y ATG3 (Nakatogawa et al., 2009). La proteína ATG8 se sintetiza en forma de precursor con una secuencia carboxi-terminal adicional, que es cortada por la proteasa ATG4, dejando expuesta una glicina. Esta glicina se une a la cisteína activa de la enzima tipo E1 ATG7, en una reacción que requiere ATP, generando la activación del extremo carboxilo de ATG8. La glicina de ATG8 activada, se une a la cisteína activa de la enzima tipo E2 ATG3. Eventualmente, se conjuga la glicina de ATG8 con el grupo amino de PE a través de un enlace amida (Yang and Klionsky, 2009).

El conjugado ATG8-PE se encuentra asociado a membranas, en concreto se encuentra en la membrana de los autofagosomas. De hecho, se piensa que la cantidad de ATG8 asociado a la membrana del autofagosoma regula el tamaño que este llegará a tener (Feng et al., 2014). Cabe destacar que la conjugación de ATG8 a PE es un proceso reversible, ya que ATG4 también puede procesar la unión entre la proteína y el lípido. De esta forma, ATG8 se libera y puede volver a ser reutilizado posteriormente (Yang and Klionsky, 2009). El sistema de conjugación de ATG8 ha demostrado ser esencial para la autofagia en mamíferos, ya que cuando este sistema no funciona los autofagosomas no pueden formarse correctamente (Sou et al., 2008).



**Figura 5:** Representación esquemática del sistema de conjugación de ATG8. Imagen adaptada de (Pérez-Pérez et al., 2010).

El segundo sistema de conjugación tipo ubiquitina es el sistema de ATG12. La proteína ATG12 se conjuga a ATG5 gracias a la acción de ATG7 y ATG10 (Glick et al., 2010). En primer lugar, la enzima tipo E1 ATG7 activa a ATG12 uniéndose a su glicina carboxiterminal, en una reacción dependiente de ATP. La proteína ATG12 activada se transfiere a la enzima tipo E2 ATG10, que a su vez cataliza la unión covalente entre ATG12 y ATG5. El conjugado ATG12-ATG5 se une no covalentemente a dímeros de ATG16, formando un complejo multimérico (Yang and Klionsky, 2009). Este complejo, que es esencial para la autofagia, se sitúa en la membrana del fagóforo durante su expansión y se disocia cuando el autofagosoma se ha formado (Glick et al., 2010).

Es importante destacar que se ha identificado en mamíferos una ruta de autofagia independiente de ATG7 y de ATG5, y por tanto, independiente de los dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (los de ATG12 y de ATG8). Esta ruta se ha denominado ruta de autofagia alternativa, para diferenciarla de la ruta convencional, que sí es dependiente de ATG7 y ATG5. Por tanto, parece que en mamíferos existen dos rutas de autofagia, una dependiente y otra independiente de los sistemas de conjugación tipo ubiquitina (Nishida et al., 2009). A pesar de que ambas conducen a la degradación de proteínas celulares, pueden presentar funciones fisiológicas distintas y activarse por distintos tipos de estrés. No obstante, esta ruta alternativa de la autofagia está aún poco caracterizada.

#### **1.2.2.2 Fusión del autofagosoma al lisosoma/vacuola y reciclaje.**

Una vez formado el autofagosoma, éste se dirige hacia el orgánulo encargado de la degradación en la célula: el lisosoma en células animales o la vacuola en levaduras, hongos, plantas y algas (Mizushima, 2007). El autofagosoma se fusiona al lisosoma o vacuola de la célula a través de su membrana externa. Se ha demostrado que en el proceso de fusión participan también proteínas SNARE (Furuta and Amano, 2010; Hegedus et al., 2013) y que la glicosilación de dichas proteínas es clave para que la fusión pueda llevarse a cabo (Mizushima, 2014).

En caso de fusionarse el autofagosoma con un lisosoma, se genera el denominado autolisosoma o autofagolisosoma (Glick et al., 2010). En células de levaduras y plantas, después de la fusión del autofagosoma a la vacuola, se aprecia la aparición dentro de la vacuola del cuerpo autofágico, que corresponde a la membrana interna del autofagosoma (Feng et al., 2014).

Por otro lado, se ha propuesto que los autofagosomas se fusionan con endosomas antes de fusionarse con el lisosoma, dando lugar a amfisomas, con el objetivo de adquirir maquinaria necesaria para la fusión con el lisosoma (Mizushima, 2007). Además, esto también ayudaría a reducir el pH del autofagosoma para facilitar su posterior degradación (Glick et al., 2010).

La etapa final de la autofagia consiste en la degradación del material dentro del lisosoma o la vacuola (Levine and Klionsky, 2004). Los subproductos generados en esta degradación son devueltos al citoplasma, para ser reutilizados en la síntesis de otras moléculas o bien para generar energía (Feng et al., 2014). La autofagia es, por tanto, un proceso de reciclaje.

#### **1.2.3 Detección de la autofagia.**

El estudio de la autofagia requiere de métodos que permitan detectar y analizar el proceso. A pesar de ser una tarea compleja, debido al gran número de etapas que componen la autofagia y a que es un proceso dinámico (Jangamreddy et al., 2014), hoy en día se dispone de múltiples métodos para detectar la autofagia en los distintos sistemas modelo. Existen métodos tanto morfológicos como bioquímicos para la detección de la autofagia (Mizushima, 2004), además de marcadores específicos de autofagia que se encuentran conservados desde levaduras hasta humanos (Klionsky et al., 2014).

### **1.2.3.1 Métodos morfológicos de detección de autofagia.**

Entre los métodos morfológicos, cabe destacar el microscopio electrónico. De hecho, la autofagia se detectó por primera vez en el año 1962 gracias al uso del microscopio electrónico (Ashford and Porter, 1962). Desde entonces, la autofagia se caracteriza morfológicamente por la aparición de autofagosomas en el citoplasma celular (Klionsky et al., 2012). Es importante destacar que el uso del microscopio electrónico permite un análisis tanto cualitativo como cuantitativo, aunque no permite determinar si el proceso autofágico llega a completarse (Klionsky et al., 2008). Por otro lado, el microscopio electrónico es uno de los métodos más precisos para detectar la autofagia, gracias a su gran resolución (Ylä-Anttila et al., 2009).

Otro método que permite caracterizar la autofagia morfológicamente es la tinción con monodansilcadaverina (MDC) (Mizushima, 2004). Este compuesto fluorescente penetra en las células y se acumula en los autofagosomas, por interacción con sus lípidos de membrana, lo que permite detectar la autofagia mediante microscopía de fluorescencia (Niemann et al., 2000; Vázquez and Colombo, 2009). No obstante, este método tampoco permite determinar si el proceso se completa. Para ello, puede utilizarse un derivado de BSA conjugado a un fluoróforo (DQ-BSA), que emite fluorescencia cuando la proteína es degradada en el lisosoma. Gracias a ello, pueden visualizarse los autolisosomas y por tanto se puede confirmar que el proceso de autofagia se ha completado (Vázquez and Colombo, 2009).

### **1.2.3.2 Métodos bioquímicos de detección de autofagia.**

De entre los métodos bioquímicos, cabe destacar la cuantificación de la degradación proteica. Teniendo en cuenta que la autofagia lleva a cabo la degradación de la mayoría de proteínas viejas en las células, este método es una buena aproximación para cuantificar los niveles de autofagia. Para ello, se marcan las proteínas celulares con aminoácidos radioactivos y posteriormente se mide la liberación de radioactividad soluble en ácido de las células (Klionsky et al., 2012; Mizushima, 2004). Para descartar la degradación no mediada por autofagia, se realiza la misma medida en paralelo en muestras tratadas con algún inhibidor de autofagia. La diferencia entre ambas medidas corresponderá a la degradación proteica mediada por autofagia (Klionsky et al., 2008).

En levaduras, se ha desarrollado el ensayo de la fosfatasa alcalina, basado en la hidrolasa vacuolar Pho8. En este ensayo se emplea una cepa de levadura mutante, con una versión modificada del gen *PHO8*, de forma que la proteína sólo puede llegar a la vacuola mediante autofagia. Cuando llega a la vacuola, la proteína Pho8 mutante madura y se convierte en una fosfatasa activa (Mizushima, 2004). Así, midiendo la actividad fosfatasa de las células u observando el cambio del peso molecular de Pho8



mediante electroforesis, se pueden cuantificar los niveles de autofagia (Klionsky et al., 2014).

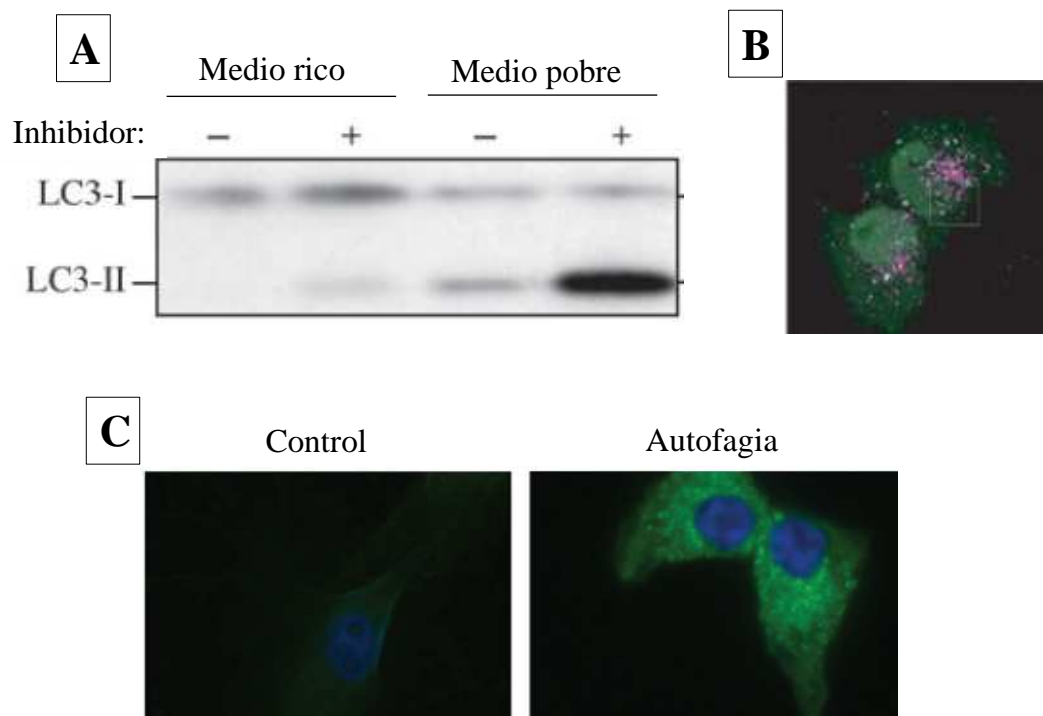
Por otro lado, encontramos los denominados ensayos de “secuestro autofágico”, que permiten estudiar la actividad autofágica midiendo la acumulación en autofagosomas de algún marcador citoplasmático. Para ello, se mide la cantidad de marcador soluble (citoplasmático) frente a la cantidad insoluble (en autofagosomas), mediante fraccionamiento celular (Klionsky et al., 2008; Klionsky et al., 2014; Klionsky et al., 2012).

### **1.2.3.3 Marcadores de autofagia.**

Finalmente, si nos centramos en los marcadores, la proteína ATG8 es el marcador de autofagia más ampliamente utilizado (Klionsky et al., 2012). Gracias a su localización en la membrana del autofagosoma y al aumento de su síntesis en condiciones de inducción de autofagia, se ha convertido en un marcador celular y molecular específico de este proceso. El homólogo de ATG8 en mamíferos está constituido por una familia de proteínas dividida en dos subfamilias: LC3 (Light Chain 3) y GABARAP (GABA receptor-associated protein), aunque la más relevante y usada como marcador es la proteína LC3 (Klionsky et al., 2008).

Como ya se ha explicado anteriormente, la proteína ATG8/LC3 se sintetiza en forma de precursor, que madura gracias a un sistema de conjugación tipo ubiquitina uniéndose al fosfolípido PE. Por tanto, puede utilizarse la localización de la proteína y su maduración como indicadores de autofagia (Mizushima, 2004).

La detección y análisis de ATG8/LC3 puede llevarse a cabo mediante distintos métodos. Uno de los más utilizados es el western blot (Figura 6), que permite visualizar tanto la cantidad de proteína como su maduración, ya que la proteína conjugada a PE presenta una mayor movilidad electroforética (Klionsky et al., 2008). Además, también puede medirse el flujo autofágico, representado por la acumulación de ATG8/LC3 cuando se inhibe la degradación vacuolar/lisosomal (Klionsky et al., 2012).



**Figura 6:** Algunos métodos de detección de autofagia (Klionsky et al., 2012). **A:** Western blot de LC3 de células en medio rico en nutrientes y en medio pobre, en presencia (+) y ausencia (-) de inhibidor de autofagia. Puede observarse la maduración de LC3-I a LC3-II (forma conjugada a PE) y el aumento en cantidad de proteína cuando las células se encuentran en medio pobre y sin inhibidor de autofagia. **B:** Imagen de un ensayo de fluorescencia RFP-GFP-LC3, en el que se observan ambos tipos de fluorescencia. **C:** Imagen de un ensayo de fluorescencia GFP-LC3, en el que se observa el aumento de puntos fluorescentes en condiciones de autofagia.

Otro de los métodos más utilizados para detectar ATG8/LC3 es la microscopía de fluorescencia, que permite visualizar la autofagia tanto por fluorescencia directa como por inmunofluorescencia (Klionsky et al., 2008; Klionsky et al., 2012). Para ello, se han creado en muchos organismos fusiones de la proteína ATG8 endógena con proteínas fluorescentes como GFP (Mizushima, 2009). Normalmente la inducción de autofagia se identifica como un aumento de puntos fluorescentes que corresponden a autofagosomas marcados gracias a la fusión GFP-ATG8 (Figura 6). Las fusiones ATG8-GFP permiten además medir la degradación autofágica, ya que mientras que la proteína ATG8 es degradada rápidamente al llegar a la vacuola o lisosoma, el dominio GFP de la fusión se mantiene estable más tiempo. Por tanto, la aparición de GFP libre (que puede ser detectada mediante western blot) indica degradación vía autofagia (Klionsky et al., 2014).

Otro ensayo de fluorescencia es el de la fusión RFP-GFP-LC3, que permite visualizar fácilmente el flujo autofágico (Kimura et al., 2009). Este ensayo se basa en que la fluorescencia de la proteína RFP es más estable que la de GFP en condiciones alcalinas como las del lisosoma (Tanida et al., 2014). Por tanto, si se observa co-localización de fluorescencia GFP y RFP, se trata de un fagóforo o autofagosoma. Mientras que si sólo

se observa fluorescencia RFP, se trataría de un autolisosoma (Figura 6) (Klionsky et al., 2012). Por último, estas herramientas fluorescentes permiten también determinar el flujo autofágico mediante citometría (Lee and Lee, 2012), lo cual resulta de gran utilidad para células que crecen en suspensión (Klionsky et al., 2012).

Aunque ATG8 es el marcador de autofagia más utilizado y para el que se disponen de más métodos de detección, existen otros marcadores que permiten complementar el estudio de la autofagia. Por ejemplo, la proteína SQSTM1 de humanos se incorpora a los autofagosomas completos y es degradada en los autolisosomas. Las proteínas ATG6, ATG9, ATG12, ATG14, ATG16 y ATG18 también pueden ser empleadas como marcadores de autofagia (Klionsky et al., 2012).

Cabe destacar que la autofagia está sometida a una importante regulación transcripcional, por lo que la inducción del proceso suele estar acompañada de un aumento en los niveles de mRNA de distintos genes *ATG*. Por tanto, el análisis de los niveles de RNA de los genes *ATG* mediante northern blot o qRT-PCR (PCR cuantitativa) constituye otro método para detectar y analizar la autofagia (Klionsky et al., 2008; Klionsky et al., 2012).

En conclusión, puede decirse que existen multitud de métodos para detectar la autofagia. El método a elegir variará en función de las circunstancias y del sistema modelo, ya que no todos los métodos funcionan igual en todos los organismos. Además, no existe un método perfecto, por lo que siempre es mejor combinar distintas aproximaciones (Klionsky et al., 2014).

#### **1.2.4 Funciones de la autofagia.**

##### **1.2.4.1 Autofagia basal.**

La autofagia es un proceso clave para el correcto funcionamiento de las células eucariotas. Por un lado, las células presentan un nivel basal de autofagia (Nakatogawa et al., 2009), cuya función es básicamente reciclar de forma constitutiva el material citoplasmático para mantener la homeostasis celular (Feng et al., 2014; Mizushima, 2007). La autofagia basal tiene una gran importancia, de hecho se ha demostrado en *Drosophila* que promover la autofagia basal en el sistema nervioso aumenta la longevidad (Simonsen et al., 2014), e incluso se postula que se requiere un nivel basal de autofagia para el correcto funcionamiento de los lisosomas (Seino et al., 2013).

La autofagia ha demostrado además ser un proceso crítico en la regulación del metabolismo, con importantes implicaciones en la salud. Por ejemplo, la autofagia participa en la regulación de las reservas celulares de glucógeno, es responsable de una parte importante del catabolismo de las proteínas, y participa en la degradación

de los lípidos. Por ello, se considera que es necesario un nivel basal de autofagia para el correcto funcionamiento metabólico (Papácková and Cahová, 2014).

#### **1.2.4.2 Autofagia como respuesta a estrés.**

Por otro lado, la autofagia se induce en situaciones de estrés, de desarrollo y de diferenciación celular para permitir que las células se adapten a estas situaciones y puedan sobrevivir (Feng et al., 2014). En el caso del estrés, este puede ser tanto extracelular (por ejemplo falta de nutrientes) como intracelular (por ejemplo acumulación de orgánulos dañados) (Levine and Klionsky, 2004).

La autofagia inducida por falta de nutrientes es el ejemplo más ampliamente estudiado, ya que la falta de cualquier tipo de nutriente esencial induce la autofagia, que recicla parte del material celular para suplir esta carencia y que la célula pueda sobrevivir (Mizushima, 2007). En situaciones que suprimen el crecimiento celular, como la falta de nutrientes, la autofagia ayuda a mantener la estabilidad genómica modulando la división celular (Matsui et al., 2013).

No obstante, hay muchos tipos de estrés que inducen la autofagia. Uno de los más importantes es el estrés oxidativo, tanto intracelular como extracelular (Filomeni et al., 2014; Moore, 2014; Perez-Perez et al., 2012b). El estrés en el retículo endoplásmico también induce la autofagia, siendo un proceso clave para la supervivencia de las células sometidas a este tipo de estrés (Ogata et al., 2006). Por otro lado, la autofagia es también la respuesta primaria de las células a la toxicidad inducida por metales (Chatterjee et al., 2014).

#### **1.2.4.3 La autofagia en el desarrollo y la diferenciación celular.**

Por último, la autofagia está íntimamente relacionada con los procesos de desarrollo y diferenciación. Ambos procesos requieren importantes cambios fenotípicos y reordenamientos específicos en las células, que son llevados a cabo gracias a la autofagia (Levine and Klionsky, 2004). Por tanto, la autofagia se considera no sólo como un proceso de reciclaje sino como un proceso de renovación citoplasmática (Cecconi and Levine, 2008).

Si nos centramos en el desarrollo, la autofagia ha demostrado ser esencial en los procesos de desarrollo temprano en especies tan distintas como *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum* y *Mus musculus* (Cecconi and Levine, 2008; Levine and Klionsky, 2004). No obstante, la autofagia también es importante en otros estadios del desarrollo. Por

ejemplo, en mamíferos se ha demostrado que la autofagia permite el desarrollo, diferenciación y homeostasis del endometrio materno (Gong and Kim, 2014).

En los procesos de diferenciación celular, la autofagia permite cambiar rápidamente la composición citoplasmática y acelerar la renovación de proteínas y orgánulos. La autofagia modifica el citoesqueleto, los factores de transcripción y los receptores de membrana, permitiendo así la remodelación celular (Cecconi and Levine, 2008). Las células madre, que se someten a múltiples procesos de diferenciación, requieren la autofagia más que otros tipos celulares. Además, la autofagia también participa en el mantenimiento del estado de quiescencia de las células madre, gracias a la eliminación de moléculas dañadas (Phadwal et al., 2013).

#### **1.2.4.4 Implicación de la autofagia en inmunidad y enfermedad.**

No menos importante es el papel que recientemente ha demostrado tener la autofagia en la inmunidad. La autofagia participa en el funcionamiento, mantenimiento, supervivencia y muerte de las células inmunitarias, debido a lo cual juega un papel relevante en la autoinmunidad, la inflamación y la respuesta a infecciones (Mintern and Harris, 2015). Cabe destacar el papel de la mitofagia en el sistema inmune, ya que las mitocondrias son el eje central en la señalización inmunitaria (Lazarou, 2015). Además, la autofagia también ha demostrado participar en la presentación antigénica, así como en el desarrollo y activación de las células T (Bronietzki et al., 2015).

Sin embargo, durante el envejecimiento la autofagia empieza a fallar y su flujo disminuye. Al ser un proceso que consta de tantas etapas, con el tiempo es susceptible a diversos errores (Schneider and Cuervo, 2014). Las consecuencias de un flujo autofágico ineficiente son la acumulación de estructuras dañadas, alteraciones en la homeostasis celular, incapacidad para adaptarse a cambios extracelulares o incluso falta de respuesta ante agentes dañinos (Papácková and Cahová, 2014). La manipulación farmacológica de la autofagia ha llegado a considerarse como una posible terapia anti-envejecimiento (Sampaio-Marques et al., 2011).

Así, la autofagia se ha relacionado con diversas enfermedades, como enfermedades metabólicas, desordenes musculares o enfermedades neurodegenerativas (Schneider and Cuervo, 2014; Shintani and Klionsky, 2004). También se ha asociado a la autofagia con enfermedades de tipo inflamatorio, como la enfermedad de Crohn, en la que la xenofagia parece estar implicada en la eliminación de cepas de *E. coli* que pueden causar dicha enfermedad (Henderson and Stevens, 2012). Cabe destacar la importancia de la mitofagia en el corazón, que acumula mitocondrias anormales y disfuncionales cuando se reduce la autofagia, generando distintas enfermedades (Ikeda et al., 2014). Por tanto, la autofagia es hoy en día una posible diana terapéutica (Schneider and Cuervo, 2014).

La autofagia también posee un papel importante en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, ya que parece tener tanto un papel anti-oncogénico como un papel pro-oncogénico (Schneider and Cuervo, 2014). De hecho, de entre las proteínas que regulan la autofagia se han encontrado tanto oncogenes como supresores tumorales. Este papel dual de la autofagia en el cáncer puede explicarse si se tiene en cuenta el estado de la enfermedad (Shintani and Klionsky, 2004). En estados tempranos, la autofagia actúa como supresor tumoral, principalmente eliminando las mitocondrias dañadas y reduciendo por tanto el daño genotóxico mediado por las especies reactivas de oxígeno (ROS: Reactive Oxygen Species). En cambio, en estados tardíos, la autofagia favorece la progresión tumoral permitiendo que las células se adapten a la falta de nutrientes (Avalos et al., 2014).

#### **1.2.4.5 Autofagia y muerte celular.**

Finalmente, la autofagia también parece desempeñar un papel importante en la muerte celular, lo que ha generado un debate aún no zanjado sobre si la autofagia es un proceso pro-vida o pro-muerte. Además de llevar a cabo procesos de reciclaje que favorecen la supervivencia celular, la autofagia participa en la muerte celular programada (PCD: Programmed Cell Death). Podemos diferenciar dos tipos de PCD: PCD de tipo I o apoptosis y PCD de tipo II o autofágica (Shintani and Klionsky, 2004).

Apoptosis y autofagia se encuentran interconectados y son mutuamente inhibitorios ya que generalmente la autofagia bloquea la apoptosis y la inducción de la apoptosis inhibe la autofagia. No obstante, en algunos casos la autofagia parece ayudar a inducir la apoptosis, mientras que en otros casos es la propia autofagia la que da lugar a la muerte celular por degradación excesiva del citoplasma (Baehrecke, 2005; Marino et al., 2014a).

La explicación más aceptada hasta el momento, es que la autofagia actúa en primer lugar intentando reestablecer la homeostasis para que la célula sobreviva. Cuando no es capaz de lograrlo, debido a la intensidad o duración del estrés, se activan los programas de muerte celular (Marino et al., 2014a; Shintani and Klionsky, 2004). En algunos casos se activa la apoptosis y en otros, probablemente cuando los reguladores apoptóticos se encuentran inhibidos o ausentes, se activa la muerte autofágica (Baehrecke, 2005).

Por tanto, la autofagia actuaría en primera instancia como un mecanismo pro-vida, que puede convertirse en un mecanismo pro-muerte si no se consigue reparar el daño. En conclusión, puede decirse que la autofagia actúa como una balanza entre la vida y la muerte, que se inclinará hacia un lado u otro en función de las circunstancias (Baehrecke, 2005; Tavassoly et al., 2015).

### 1.3 Autofagia en organismos fotosintéticos.

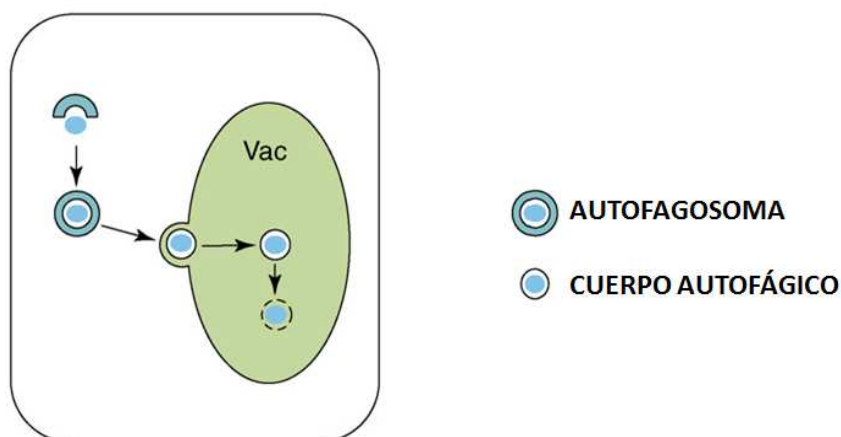
Los organismos fotosintéticos, tales como el sistema modelo empleado en la presente Tesis Doctoral, son organismos autótrofos capaces de convertir la luz solar en materia orgánica. Por tanto, su fisiología y metabolismo es muy distinto al de las células animales, levaduras u hongos. Por ello, es importante investigar cómo se desarrolla y regula la autofagia en este tipo de organismos.

Al igual que otros eucariotas, los organismos fotosintéticos han desarrollado mecanismos para reciclar el material intracelular durante situaciones de estrés, de desarrollo o de diferenciación. La autofagia constituye uno de los mecanismos de reciclaje más importantes también en organismos fotosintéticos (Thompson and Vierstra, 2005).

La maquinaria central de la autofagia y los sistemas de conjugación tipo ubiquitina (ATG8 y ATG12) se encuentran perfectamente conservados tanto en plantas como en algas, lo que resalta la importancia de este proceso degradativo en organismos fotosintéticos (Díaz-Troya et al., 2008b; Floyd et al., 2012; Thompson and Vierstra, 2005). Se han identificado homólogos de los distintos genes *ATG* en varias especies de plantas (Chung et al., 2009; Thompson et al., 2005) y de microalgas (Díaz-Troya et al., 2008b; Jiang et al., 2012; Shemi et al., 2015; Zhao et al., 2014). La proteína ATG8 juega también un papel central en la autofagia de los organismos fotosintéticos, siendo esencial para la formación del fagóforo y del autofagosoma así como para procesos de autofagia selectiva (Li and Vierstra, 2012).

#### 1.3.1 Autofagia en plantas.

En plantas, los genes *ATG* se encuentran muy conservados respecto a los de levadura y mamíferos (Kim et al., 2012; Liu and Bassham, 2012), lo que implica que los mecanismos de la autofagia deben estar también conservados. En la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, los genes *ATG* se encuentran codificados por familias génicas, dentro de las cuales se observan pequeñas variaciones de secuencia (Avin-Wittenberg et al., 2012).



**Figura 7:** Representación esquemática del proceso autofágico en una célula de planta. Vac: vacuola. Imagen adaptada de Bassham, 2007.

Dentro del complejo ATG1, se han identificado en *Arabidopsis* tres genes *ATG1* y dos genes *ATG13* putativos. Estos últimos presentan una región de homología muy pequeña, por lo que no puede confirmarse que sean realmente genes *ATG13* (Díaz-Troya et al., 2008b; Suttangkakul et al., 2011). Dentro del complejo PtdIns3K, se ha encontrado un único homólogo para los genes *PtdIns3K*, *VPS15*, *VPS34* y *ATG6*, aunque no se ha encontrado ningún homólogo de *ATG14* (Díaz-Troya et al., 2008b; Liu and Bassham, 2012).

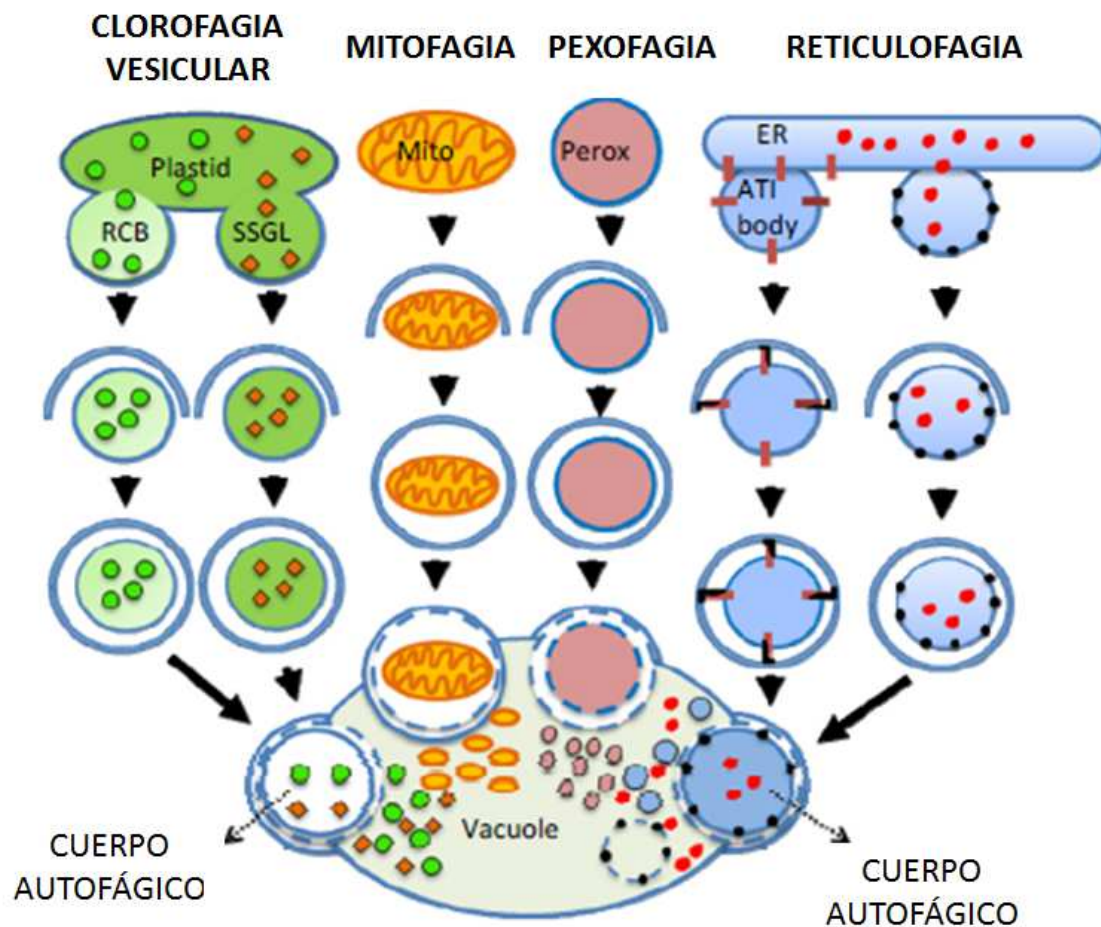
Del sistema de ATG8, se han identificado en *Arabidopsis* hasta nueve genes *ATG8*, tres de los cuales no presentan secuencia carboxiterminal adicional, lo que significa que pueden funcionar sin necesidad de ser procesados por ATG4 (Li and Vierstra, 2012; Thompson and Vierstra, 2005). Los nueve genes *ATG8* se expresan simultáneamente en la planta en condiciones normales de crecimiento, aunque con distintos patrones de expresión (Liu and Bassham, 2012). Además, se ha encontrado un gen *ATG3* y dos genes *ATG4*.

El sistema ATG12 de *Arabidopsis* está formado por un gen *ATG5*, un gen *ATG10* y dos genes *ATG12*. Se ha identificado un único gen para *ATG7*, que participa en los dos sistemas de conjugación (Liu and Bassham, 2012). El sistema de ATG12 ha demostrado ser esencial para la autofagia en plantas (Suttangkakul et al., 2011). Por otro lado, el complejo ATG9 también se encuentra funcionalmente conservado y en *Arabidopsis* se ha identificado un gen *ATG2*, un gen *ATG9* y una familia génica *ATG18* (Díaz-Troya et al., 2008b; Liu and Bassham, 2012).

Se sospecha que en plantas también existe una ruta de autofagia alternativa, independiente de los sistemas ATG8 y ATG12, ya que los mutantes de plantas para estos sistemas son viables (Li and Vierstra, 2012). Existen pocas evidencias al respecto, pero se han observado en distintas especies de cereales vesículas autofágicas no recubiertas de ATG8, que se fusionan con la vacuola (Reyes et al., 2011).



Por otro lado, también existen evidencias de la existencia de autofagia selectiva en plantas (Floyd et al., 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que la autofagia está envuelta en el tráfico de antocianina a la vacuola para su almacenaje (Pourcel et al., 2010) y en la degradación selectiva de porfirinas y agregados proteicos (Floyd et al., 2012; van Doorn and Papini, 2013). También se dan en plantas procesos de mitofagia, pexofagia, ribofagia y reticulofagia (Michaeli and Galili, 2014; van Doorn and Papini, 2013).



**Figura 8:** Autofagia selectiva en plantas. Se representa la clorofagia vesicular, la mitofagia, la pexofagia y la reticulofagia. Plastid: cloroplasto, RCB: vesículas de Rubisco (Rubisco Containing Bodies), SSGL: Gránulos pequeños de almidón (Small Starch Granule-Like), Mito: mitocondria, Perox: peroxisoma, ER: retículo endoplasmático, ATI body: vesícula ATI, Vacuole: vacuola. Imagen adaptada de Michaeli and Galili, 2014.

La proteína ATG8 es la encargada de reconocer las dianas a degradar en los procesos de autofagia selectiva en plantas uniéndose a proteínas que contienen el dominio AIM (ATG8 Interacting Motive), que pueden ser las propias dianas o bien adaptadores que marcan el material a degradar (Michaeli and Galili, 2014).

Cabe destacar la degradación vía autofagia de los cloroplastos anormales o defectuosos enteros, denominada clorofagia (Michaeli and Galili, 2014; Niwa et al., 2004). Además, la autofagia también participa en la degradación de los denominados cuerpos RCB (Rubisco containing bodies), que son vesículas autofágicas que contienen específicamente Rubisco y proteínas estromales, pero no membrana tilacoidal. Se ha propuesto que a partir de la formación de pequeñas protuberancias en el cloroplasto, la maquinaria autofágica es capaz de capturar selectivamente porciones del orgánulo sin dismantelar el aparato fotosintético (Floyd et al., 2012; Michaeli and Galili, 2014). Además, se ha observado también autofagia selectiva de almidón (Wang et al., 2013). En el caso de la degradación específica de componentes del cloroplasto (como Rubisco o almidón) se habla de clorofagia vesicular para distinguirla de la autofagia de cloroplastos enteros, denominada clorofagia (Michaeli and Galili, 2014).

Otra característica interesante de los cloroplastos es que, en algunas especies de plantas, parece que pueden funcionar de forma similar a autolisosomas. Lo hacen mediante un proceso similar a la endocitosis celular, en el que se produce una invaginación de las dos membranas externas que envuelve una porción del citoplasma. El lumen de la vesícula de doble membrana generada presenta fosfatasa alcalina, y el material interno es degradado sin que la vesícula se fusione a ninguna vacuola (van Doorn et al., 2014).

Recientemente, se ha identificado en plantas un tipo de autofagia selectiva que se encarga de transportar componentes del retículo endoplasmático a la vacuola (Honig et al., 2012), y que ha sido denominada como vía ERvt en analogía a la vía Cvt de levaduras (Bassham et al., 2014). En esta vía participan las proteínas ATI1 y ATI2 (ATG8 Interacting Protein), que son exclusivas de plantas, y que se unen a ATG8 para formar las llamadas vesículas ATI. Estas vesículas siguen la misma vía que los autofagosomas y se fusionan con la vacuola (Michaeli and Galili, 2014). Además, la proteína ATI1 también participa en un vía de transporte autofágica del cloroplasto a la vacuola (Michaeli et al., 2014).

Una diferencia significativa entre plantas y organismos no fotosintéticos, es que los autofagosomas de plantas en ocasiones se acidifican, antes de fusionarse a la vacuola, gracias a la presencia de fosfatasa alcalina y de ATPasas de protones (Floyd et al., 2012). Esto ayuda a iniciar la degradación del material que se encuentra dentro del autofagosoma, activando las enzimas proteolíticas de su interior. Además, los autofagosomas de plantas contienen hidrolasas desde su formación (van Doorn and Papini, 2013). Por tanto, este sistema de acidificación ayuda o complementa a la acción degradativa de la vacuola en plantas (Takatsuka et al., 2011). Por ello, al tratarse de autofagosomas que comparten características con los lisosomas, se han denominado autolisosomas (van Doorn and Papini, 2013).

En cuanto al origen de la membrana del autofagosoma, se desconoce si en plantas puede provenir de distintos orgánulos, como se sospecha en mamíferos (Liu and Bassham, 2012). Se han propuesto dos mecanismos de formación del fagóforo en

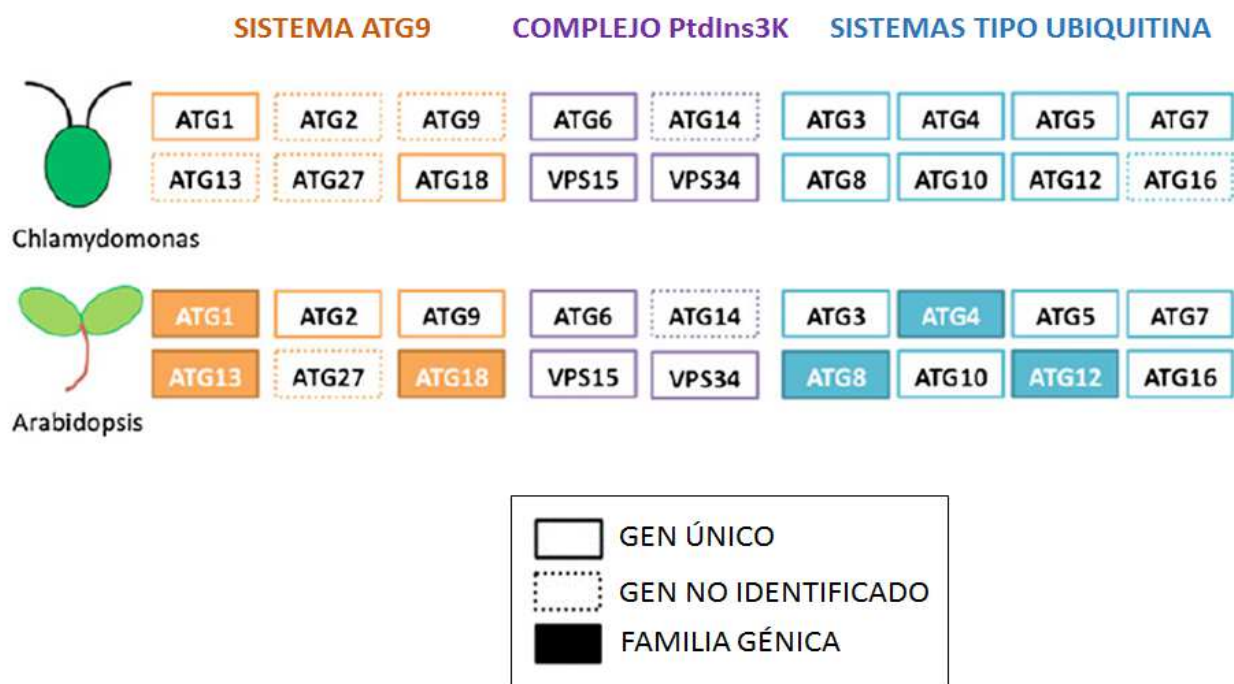
plantas. En el primero, se forman unos túbulos de doble membrana entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático, con hidrolasas en su interior, que se fusionan lateralmente para formar el autofagosoma o autolisosoma. En el segundo, dos membranas situadas una enfrente de la otra se fusionarían para dar lugar al autofagosoma (van Doorn and Papini, 2013). Por otro lado, se ha demostrado en *Arabidopsis* que ciertas proteínas SNARE participan tanto en la formación del autofagosoma como en su fusión a la vacuola (Thompson and Vierstra, 2005).

Por último, el autofagosoma se fusiona con la vacuola lítica de las plantas (funcionalmente equivalente a la vacuola de levaduras o lisosoma animal) y libera a su interior el cuerpo autofágico (Bassham et al., 2014). El material de su interior se degrada y los subproductos obtenidos se exportan al citoplasma para su reutilización, aunque no se posee mucha información de esta etapa de reciclaje en plantas (Bassham, 2009).

### **1.3.2 Autofagia en microalgas.**

Las proteínas que constituyen la maquinaria central de la autofagia se encuentran también muy conservadas en microalgas, por lo que los mecanismos moleculares de la autofagia deben ser similares a los de otros organismos como las levaduras (Díaz-Troya et al., 2008b; Pérez and Crespo, 2014; Shemi et al., 2015). Cabe destacar que en microalgas no se han encontrado aún homólogos de ATG9, la proteína implicada en expandir la membrana del fagóforo. Se desconoce si el sistema de ATG9 existe en microalgas o si existe pero se encuentra menos conservado (Díaz-Troya et al., 2008b; Jiang et al., 2012; Pérez and Crespo, 2014; Shemi et al., 2015).

Dentro de las microalgas, la más utilizada como modelo para el estudio de la autofagia actualmente es *Chlamydomonas*. En su genoma se han encontrado homólogos de los genes *ATG* tanto de levadura como de plantas (Díaz-Troya et al., 2008b). Al contrario que las plantas, *Chlamydomonas* no presenta isoformas ni familias de los genes *ATG*, por lo que su complejidad es menor. Estas características, junto con otras que se discutirán más adelante, convierten a *Chlamydomonas* en un buen modelo fotosintético para el estudio de la autofagia (Pérez-Pérez and Crespo, 2010).



**Figura 9:** Maquinaria central de la autofagia en organismos fotosintéticos. Para cada componente, se indica si el sistema modelo presenta un solo gen, una familia génica o ausencia de dicho gen. Imagen adaptada de Avin-Wittenberg et al., 2012.

Del complejo ATG1, que participa en la formación del fagóforo y del autofagosoma en levaduras, sólo se ha encontrado conservado en *Chlamydomonas* el gen de ATG1. Esto puede significar que *Chlamydomonas* presenta una regulación distinta en las primeras etapas de la autofagia. Dentro del complejo PtdIns3K, se han identificado todos los genes implicados excepto ATG14. Por último, en los sistemas de conjugación tipo ubiquitina (ATG8 y ATG12) se encuentran conservados todos los componentes, exceptuando ATG16 (Pérez and Crespo, 2014). Cabe destacar que la proteína ATG8 de *Chlamydomonas* ha demostrado poder reemplazar funcionalmente a su homólogo de levadura (Pérez-Pérez et al., 2010), lo que demuestra el alto grado de conservación de la autofagia entre especies.

### 1.3.3 Detección de la autofagia en organismos fotosintéticos.

Los métodos disponibles para estudiar la autofagia en organismos fotosintéticos son similares a los ya mencionados en el apartado 1.2.3 (Detección de la autofagia), aunque no todos los métodos funcionan igual en organismos fotosintéticos, y en ocasiones deben adaptarse al sistema modelo de trabajo.

### 1.3.3.1 Detección de la autofagia en plantas.

En plantas, se disponen de múltiples métodos de detección de autofagia, tanto morfológicos como bioquímicos. Dentro de los métodos usados para detectar la autofagia a nivel morfológico, cabe destacar la microscopía electrónica y la microscopía confocal, que permiten identificar los distintos compartimentos autofágicos (Klionsky et al., 2012; Li and Vierstra, 2012).

Un buen método para visualizar la actividad autofágica gracias al microscopio electrónico, es el uso de Concanamicina A (ConcA). Este compuesto inhibe las bombas de protones de la vacuola, por lo que no puede acidificarse y la degradación de macromoléculas en su interior queda bloqueada. Los cuerpos autofágicos, resultantes de la fusión de los autofagosomas a la vacuola (Klionsky et al., 2012), se acumulan en su interior en proporción a la magnitud de actividad autofágica. Mediante microscopía electrónica puede visualizarse esta acumulación de cuerpos autofágicos dentro de la vacuola (Bassham, 2014).

Además, en plantas también se ha empleado la tinción con compuestos acidófilos para detectar vesículas autofágicas (Li and Vierstra, 2012), lo que permite análisis rápidos y sencillos. La Monodansilcadaverina (MDC), que además de ser acidófila presenta cierta selectividad por los autofagosomas, también funciona en plantas (Bassham, 2014; Contento et al., 2005).

Por otro lado, los métodos bioquímicos disponibles en plantas también permiten realizar un análisis cuantitativo sobre la actividad de la autofagia (Bassham, 2014). Estos métodos suelen ir acompañados del uso de marcadores específicos de autofagia. En plantas, el marcador de autofagia más utilizado es también ATG8.

La proteína ATG8 puede visualizarse mediante western blot, que permite determinar tanto la cantidad de proteína como su estado de maduración. En *Arabidopsis* existen anticuerpos comerciales contra la proteína ATG8, aunque al existir nueve genes ATG8 en esta planta los resultados obtenidos suelen ser complejos (Bassham, 2014; Li and Vierstra, 2012).

Al igual que en otros organismos, la proteína ATG8 de plantas puede fusionarse a proteínas fluorescentes como GFP. El marcador GFP-ATG8 ha sido ampliamente utilizado para visualizar los autofagosomas por microscopía de fluorescencia (Contento et al., 2005) y para determinar el flujo autofágico por western blot, que permite visualizar la proteína GFP libre después de la degradación de ATG8 (Bassham, 2014; Klionsky et al., 2012; Li and Vierstra, 2012).

Además de ATG8, pueden utilizarse en plantas otros marcadores que también se localizan en los autofagosomas, como ATG1, ATG11 y ATG13 (Li et al., 2014; Suttangkakul et al., 2011). ATG5 ha sido empleado como marcador de fases tempranas de la autofagia, ya que se encuentra asociado a los fagóforos en crecimiento, pero se

disocia de la membrana en el autofagosoma completo (Bassham, 2014). Por otra parte, la expresión de algunos genes *ATG* de plantas también puede ser inducida en condiciones de activación de autofagia, por lo que pueden emplearse técnicas de northern blot y de qRT-PCR para detectar la inducción transcripcional de la autofagia (Contento et al., 2004; Osuna et al., 2007).

Para detectar la autofagia selectiva en plantas se han utilizado marcadores fluorescentes fusionados al péptido señal del orgánulo en cuestión (Bassham, 2014). Por ejemplo, se han fusionado proteínas fluorescentes con el péptido señal del estroma del cloroplasto (Ishida et al., 2008).

### **1.3.3.2 Detección de la autofagia en microalgas.**

Si nos centramos en las microalgas, el sistema más utilizado para el estudio de la autofagia es *Chlamydomonas*. En esta microalga pueden emplearse los métodos básicos de detección de autofagia, como la microscopía electrónica (Ramundo et al., 2014). A nivel molecular, la proteína ATG8 de *Chlamydomonas* ha sido utilizada como marcador específico de la autofagia (Pérez and Crespo, 2014), al igual que en otros organismos.

Se disponen de anticuerpos contra la proteína ATG8 de *Chlamydomonas*, por lo que se puede determinar la abundancia y lipidación de esta proteína, indicativos de la activación de la autofagia (Klionsky et al., 2012; Pérez and Crespo, 2014). También se puede visualizar la localización y distribución celular de la proteína ATG8 mediante inmunofluorescencia (Klionsky et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2010). Además, en *Chlamydomonas* pueden emplearse técnicas de qRT-PCR para detectar la inducción transcripcional de distintos genes de autofagia (Perez-Martin et al., 2014).

Cabe destacar que los anticuerpos contra la proteína ATG8 de *Chlamydomonas* han demostrado reconocer también a las distintas isoformas de ATG8 de *Arabidopsis* (Alvarez et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2010). Por ello, se ha propuesto que el uso de los anticuerpos para ATG8 de *Chlamydomonas* en *Arabidopsis* puede resultar una alternativa útil al uso de los propios anticuerpos de la planta (Bassham, 2014).

Al contrario que en plantas, no se ha publicado el uso de compuestos acidófilos para detectar la autofagia en *Chlamydomonas*, posiblemente porque se disponen de anticuerpos para ATG8 que permiten visualizar de forma específica los autofagosomas, a diferencia de los compuestos acidófilos que se acumulan en cualquier compartimento ácido. No obstante, sí se ha utilizado la MDC en la microalga *Auxenochlorella protothecoides* como marcador de autofagia (Zhao et al., 2014).

Por tanto, podemos concluir que existen diversos métodos para la detección de autofagia en organismos fotosintéticos, tanto en plantas como en microalgas, aunque en estas últimas se encuentran en muchas ocasiones menos desarrollados.

#### **1.3.4 Funciones de la autofagia en organismos fotosintéticos.**

La autofagia es un proceso muy importante en organismos fotosintéticos, que presenta algunas funcionalidades únicas en plantas y microalgas, debido a las particularidades de este tipo de organismos. Sin embargo, en términos generales, la autofagia permite responder tanto a plantas como a algas a situaciones de estrés, a procesos de desarrollo y diferenciación o incluso a infecciones, al igual que en el resto de organismos eucariotas.

En plantas, la autofagia no es un proceso esencial, ya que los mutantes de autofagia son viables, a pesar de presentar una aceleración en la senescencia y defectos sutiles en el crecimiento (Avila-Ospina et al., 2014; Bassham et al., 2014). No obstante, la autofagia juega en plantas un papel central en muchos procesos fisiológicos y de desarrollo (Bassham, 2009; Thompson and Vierstra, 2005).

##### **1.3.4.1 Autofagia basal en organismos fotosintéticos.**

Se ha demostrado la existencia de un nivel basal de autofagia en plantas, que contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular (Bassham, 2007; Liu and Bassham, 2012), al igual que en otros organismos. Así, se ha comprobado que la deficiencia de autofagia en *Arabidopsis* provoca una acumulación de proteínas ubiquitinadas, estrés en el retículo endoplasmático y finalmente muerte celular (Munch et al., 2014).

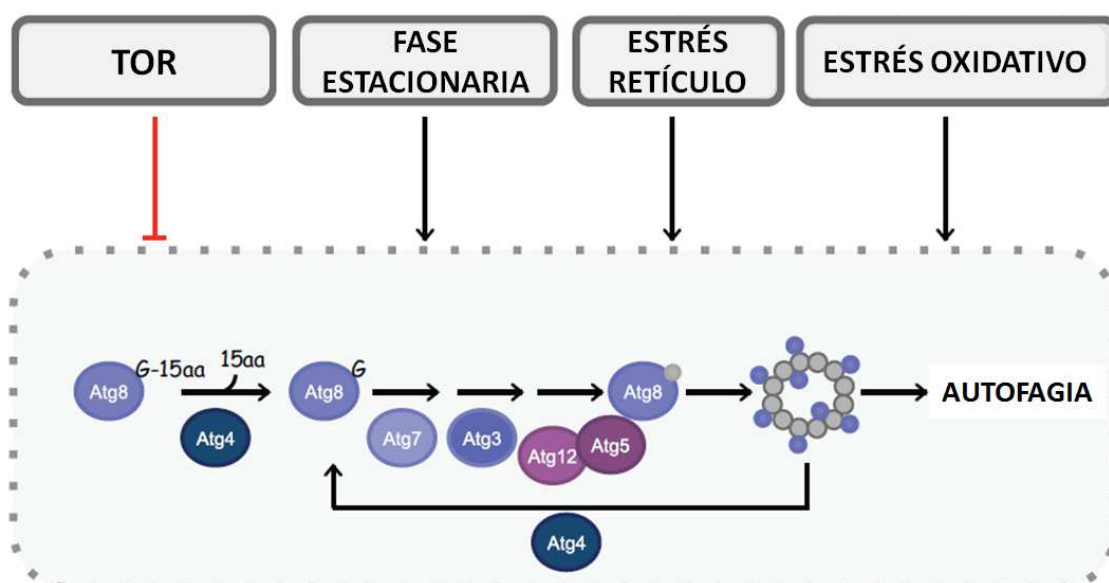
Además, se ha demostrado que la autofagia tiene en plantas un papel importante en asegurar la disponibilidad de nutrientes durante la noche, ya que participa en la degradación del almidón y puede proporcionar fuentes de energía alternativas como aminoácidos (Izumi et al., 2013a; Izumi et al., 2013b; Ren et al., 2014; Wang et al., 2013). En microalgas, la autofagia parece estar implicada en la producción de lípidos, por lo que la modificación biotecnológica del proceso podría resultar de interés para la producción de biocombustibles (Jiang et al., 2012).

### 1.3.4.2 Autofagia como respuesta a estrés en organismos fotosintéticos.

Una de las principales funciones de la autofagia en organismos fotosintéticos es la respuesta a situaciones de estrés, ya que permite la adaptación de las células a diversas condiciones. Por ello la autofagia es crítica para la supervivencia de las plantas, ya que éstas se encuentran frecuentemente con condiciones ambientales adversas (Bassham et al., 2014). Por ejemplo, la limitación de nutrientes, el estrés salino y la sequía inducen fuertemente la autofagia (Bassham et al., 2014; Liu et al., 2014).

Además, la autofagia es una vía de reciclaje del retículo endoplasmático en plantas, que se activa ante situaciones que provocan estrés en dicho orgánulo (Liu et al., 2012). También la autofagia es la encargada de degradar las proteínas oxidadas generadas como consecuencia del estrés oxidativo en *Arabidopsis* (Xiong et al., 2007). De hecho, la autofagia es clave para responder al estrés oxidativo en plantas (Bassham, 2007), ya que normalmente limita la producción de ROS (Kim et al., 2012), y se ha comprobado que la deficiencia de autofagia provoca un estrés oxidativo constitutivo (Xiong et al., 2014).

Por otro lado, la autofagia inducida por restricción calórica extiende la esperanza de vida en plantas, al igual que se ha demostrado en organismos no fotosintéticos, por lo que este mecanismo se encuentra conservado entre autótrofos y heterótrofos (Minina et al., 2013).



**Figura 10:** Condiciones que inducen la autofagia en *Chlamydomonas*. Imagen adaptada de Pérez and Crespo, 2014.



En microalgas, la autofagia es inducida por falta de nutrientes, limitación de carbono o nitrógeno, estrés en el retículo endoplasmático y estrés oxidativo (Figura 10) (Pérez-Pérez et al., 2012; Pérez-Pérez and Crespo, 2010; Pérez and Crespo, 2014). Se ha encontrado en *Chlamydomonas* que existe una conexión entre autofagia y ciclo celular y que el envejecimiento celular induce este proceso degradativo (Figura 10) (Pérez-Pérez et al., 2010). Además, se ha demostrado que existe una conexión entre daño foto-oxidativo, acumulación de ROS y autofagia en *Chlamydomonas*, de forma que cuando esta microalga presenta defectos en la síntesis de carotenoides, que previenen el daño foto-oxidativo, se induce la autofagia (Pérez-Pérez et al., 2012).

#### **1.3.4.3 La autofagia en el desarrollo y la diferenciación de organismos fotosintéticos.**

La autofagia participa en múltiples procesos de desarrollo en plantas, como la formación de la vacuola, la formación de las semillas o la senescencia (Bassham, 2009; Bassham et al., 2014; Ren et al., 2014). Se ha demostrado que la autofagia podría participar en la determinación del número de flores fértiles en trigo (Ghiglione et al., 2008). Además, la autofagia está también implicada en la formación del xilema y del floema, en la formación de las hojas y en la germinación del polen (Bassham, 2009; Liu and Bassham, 2012).

#### **1.3.4.4 Implicación de la autofagia en la respuesta inmune en organismos fotosintéticos.**

La autofagia tiene también un papel importante en la inmunidad innata de las plantas y en la respuesta a multitud de patógenos (Bassham, 2009). La respuesta hipersensible o HR (Hipersensitive Response) es una estrategia que presentan las plantas para defenderse de los patógenos, mediante la cual se induce rápidamente la muerte celular de las células infectadas para restringir la expansión del patógeno a las células adyacentes (Heath, 2000). La autofagia se encarga de restringir la HR a los sitios de infección para que no se extienda innecesariamente por la planta (Zhou et al., 2014). Para ello, se ha propuesto que la autofagia puede eliminar señales de muerte celular, además de reparar daños celulares (Bassham et al., 2014). En microalgas, se ha demostrado que la autofagia participa en la propagación vírica durante el proceso de infección (Schatz et al., 2014).

#### **1.3.4.5 Autofagia y muerte celular en organismos fotosintéticos.**

La autofagia está implicada en la muerte celular en plantas (Bassham, 2009), lo que resulta en principio contrario a su función adaptativa para promover la supervivencia celular (Bassham, 2007). De nuevo, nos encontramos con que la autofagia puede tener funciones pro-vida o pro-muerte. Así, al igual que la autofagia restringe la HR, también participa en los procesos de muerte celular en el sitio de infección (Minina et al., 2014). Además, la autofagia participa en los procesos de muerte celular durante el desarrollo normal de la planta (Liu and Bassham, 2012).

Se ha propuesto que la autofagia actúa en plantas como un mecanismo pro-vida o pro-muerte después de una infección, dependiendo del tipo de patógeno, de los factores inmunitarios implicados y de la edad de la planta. Así, la autofagia funcionaría como un mecanismo pro-vida ante infecciones de patógenos necrotróficos (que se alimentan de células muertas) y como un mecanismo pro-muerte ante infecciones de patógenos biotróficos (que se alimentan de células vivas) (Lenz et al., 2011; Liu and Bassham, 2012).

En conclusión, la autofagia presenta múltiples funciones en organismos fotosintéticos, desde la respuesta a situaciones de estrés o a patógenos hasta su participación en los procesos de desarrollo y diferenciación.

#### **1.4 Regulación de la autofagia.**

La autofagia, como ya se ha comentado anteriormente, es un proceso que permite a las células adaptarse y sobrevivir a diversidad de situaciones. No obstante, una deficiencia o un exceso de actividad autofágica es perjudicial para las células (Chen and Klionsky, 2011) y los defectos en la autofagia se asocian con multitud de enfermedades. Por tanto, la autofagia debe estar perfectamente regulada tanto espacial como temporalmente. Comprender los mecanismos que regulan la autofagia es esencial para el estudio del proceso, siendo una parte importante de la presente Tesis Doctoral.

### **1.4.1 Vías de señalización.**

#### **1.4.1.1 Vía de señalización TOR.**

La quinasa TOR (Target Of Rapamycin) es una proteína esencial conservada evolutivamente que integra señales nutricionales para regular el crecimiento celular en todos los organismos eucariotas (Cebollero and Reggiori, 2009; Díaz-Troya et al., 2008b). La vía de señalización TOR promueve procesos anabólicos necesarios para el crecimiento, como la transcripción, la síntesis proteica y la biogénesis de ribosomas. Por otro lado, TOR también inhibe procesos catabólicos como la autofagia (Jung et al., 2010).

TOR es una proteína de alto peso molecular (unos 250 KDa) que forma dos complejos celulares estructural y funcionalmente distintos, denominados TORC1 y TORC2 (TOR Complex 1 y TOR Complex 2, respectivamente) (Loewith et al., 2002). TORC1 regula el crecimiento celular temporal mientras que TORC2 regula el crecimiento celular espacial. Se ha comprobado que los complejos TOR se encuentran asociados a membranas en distintas especies (Díaz-Troya et al., 2008b).

En mamíferos, mTORC1 está formado por mTOR (mammalian TOR), Raptor (Rapamycin associated protein of TOR) y mLST8, aunque PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40 KDa) y DEPTOR (DEP domain containing mTOR-interacting protein) también pueden asociarse a mTORC1 y lo regulan negativamente. mTORC1 es sensible al inmunosupresor Rapamicina, que inhibe la actividad del complejo. mTORC2 está formado por mTOR y mLST8 (igual que mTORC1), además de Rictor (Rapamycin insensitive companion of TOR), SIN1 y Protor. Al contrario que mTORC1, mTORC2 es insensible a Rapamicina (Dunlop and Tee, 2014).

En condiciones de suficiencia de nutrientes mTORC1 se encuentra activo e inhibe la autofagia, aunque siempre se mantienen unos niveles basales de autofagia que contribuyen a la homeostasis celular. En cambio, en condiciones de limitación de nutrientes mTORC1 se inactiva permitiendo la inducción de la autofagia (Díaz-Troya et al., 2008b). mTORC1 actúa inhibiendo al complejo ULK1 (UNC-51 Like Kinase), homólogo a ATG1 en mamíferos y necesario para la iniciación de la autofagia. mTORC1 fosforila a ATG13, reduciendo su afinidad por ULK1 y desestabilizando el complejo (Russell et al., 2014). Por otro lado, ULK1 debe ser ubiquitinado para mejorar su estabilidad y promover su activación. mTORC1 inhibe esta ubiquitinación, al inhibir la proteína responsable de llevarla a cabo, AMBRA1 (Autophagy-Beclin 1 regulator 1). Cuando la autofagia se activa, ULK1 fosforila a AMBRA1, que participa en la expansión del fagóforo (Cianfanelli et al., 2015). Por otro lado, mTORC2 activa indirectamente a mTORC1 a través de Akt/PKB, por lo que también regula la autofagia negativamente (Jung et al., 2010).

En levaduras, encontramos dos genes TOR: TOR1 y TOR2. TORC1 de levaduras está formado por TOR1 o TOR2, KOG1 (ortólogo de Raptor), LST8 y TCO89. Mientras que TORC2 está formado por TOR2, LST8, AVO1 (ortólogo de SIN1), AVO2, AVO3 (ortólogo de Rictor) y BIT61. TORC1 puede ser inhibido por Rapamicina a través de la interacción con el complejo FKBP12-Rapamicina, mientras que TORC2 es insensible a dicha droga (Crespo and Hall, 2002; Loewith et al., 2002).

Al igual que en mamíferos, en presencia de nutrientes TORC1 de levaduras actúa fosforilando a ATG13, lo que desestabiliza el complejo ATG1 e inhibe su actividad quinasa impidiendo la activación de la autofagia (Inoue and Klionsky, 2010; Jung et al., 2010). Además, TORC1 activa un regulador negativo de la autofagia denominado PP2A, lo que significa que TORC1 inhibe la autofagia a través de más de un mecanismo (He and Klionsky, 2009; Inoue and Klionsky, 2010). Por otro lado, TORC2 regula la polarización del citoesqueleto de actina (Díaz-Troya et al., 2008b) y la progresión del ciclo celular desde G1 (Kunz et al., 1993), controlando de esta forma el crecimiento celular temporal y espacialmente (Schmidt et al., 1996). Recientemente, se ha demostrado que TORC2 también regula la autofagia indirectamente, por vías distintas a TORC1 (Vlahakis and Powers, 2014).

La vía de señalización TOR se encuentra también conservada en organismos fotosintéticos, tanto en plantas como en microalgas, regulando el crecimiento celular (Díaz-Troya et al., 2008b) (Figura 8). El genoma de *Chlamydomonas* contiene un único gen *TOR* (*CrTOR*), y se ha demostrado que el complejo TOR de esta microalga puede ser inhibido por rapamicina a través de su interacción con la proteína FKBP12 (Crespo et al., 2005). *Chlamydomonas* presenta un complejo TORC1 conservado, y se ha identificado en su genoma un gen homólogo a *KOG1/Raptor* y un gen *LST8* (Díaz-Troya et al., 2008b). Se ha demostrado que TOR y LST8 se encuentran formando parte de un complejo de elevada masa molecular, asociado a membranas del retículo endoplasmático en *Chlamydomonas* (Díaz-Troya et al., 2008a). También se ha demostrado que TOR actúa como regulador negativo de la autofagia en esta microalga, ya que la inhibición de esta quinasa mediante rapamicina conduce a la activación de dicho proceso catabólico (Pérez-Pérez et al., 2010).

Dentro de las plantas, *Arabidopsis* presenta en su genoma un único gen *TOR* (*AtTOR*) y un único gen *FKBP12*. Sin embargo, al contrario de lo que sucede en *Chlamydomonas*, la proteína FKBP12 de *Arabidopsis* no es capaz de unir rapamicina (Xu et al., 1998), por lo que esta planta modelo es insensible a la acción de dicha droga (Menand et al., 2002), lo que ha dificultado técnicamente el estudio de esta vía de señalización en plantas. A pesar de ello, se ha demostrado que TOR actúa como un regulador negativo de la autofagia también en plantas (Liu and Bassham, 2010). El complejo TORC1 se encuentra también conservado en *Arabidopsis*, que presenta dos genes homólogos a *KOG1/Raptor* (*AtRaptor1A* y *AtRaptor1B*) (Anderson et al., 2005) y dos genes *LST8* (*AtLST8.1* y *AtLST8.2*) (Díaz-Troya et al., 2008b).

Por otro lado, no se han identificado hasta el momento homólogos de los componentes de TORC2 en plantas o algas, por lo que se ha sugerido que este complejo no se encuentra estructuralmente conservado en organismos fotosintéticos. No obstante, cabe la posibilidad de que plantas y algas mantengan un complejo TORC2 funcional, aunque sus componentes sean distintos a los de otros organismos (Díaz-Troya et al., 2008b).

#### **1.4.1.2 Otras vías de señalización.**

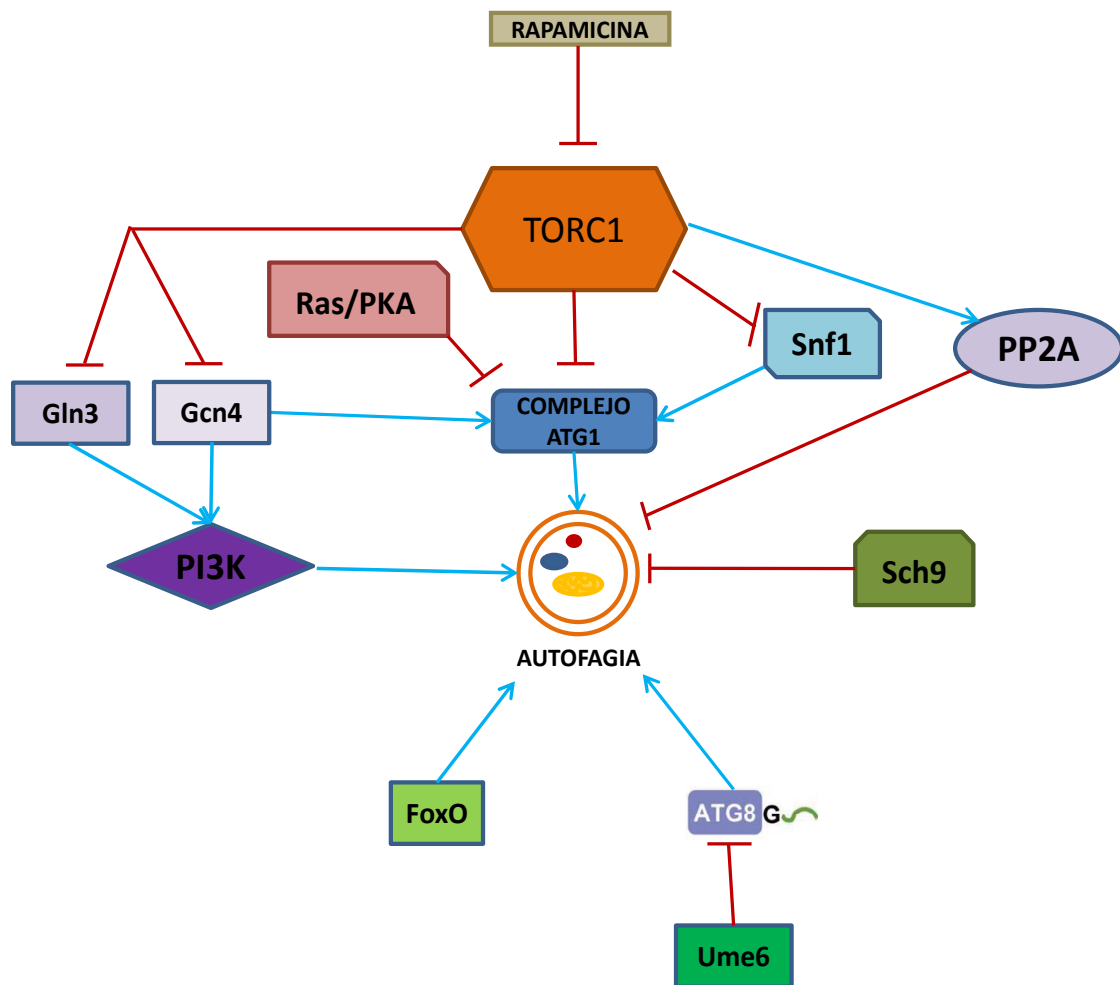
Además de la vía de señalización TOR, existen otras vías implicadas en la regulación de la autofagia, aunque en muchos casos convergen en TOR. A continuación se detallan las vías de señalización más relevantes implicadas en la regulación de la autofagia.

La vía de señalización Ras/PKA (Ras/cAMP-dependent protein kinase A) participa en la detección de fuentes de carbono en distintas especies, desde levaduras hasta mamíferos. Además, la vía Ras/PKA regula negativamente la autofagia en paralelo con la vía TOR (Cebollero and Reggiori, 2009; Inoue and Klionsky, 2010).

En levaduras, Ras/PKA fosforila a ATG1 cuando las células se encuentran en presencia de nutrientes, provocando su disociación del PAS. En cambio, en ausencia de nutrientes ATG1 se desfosforila y se localiza de nuevo en el PAS, permitiendo la iniciación de la autofagia (He and Klionsky, 2009). Por otro lado, Ras/PKA también fosforila a ATG13 y se ha identificado una secuencia consenso de fosforilación PKA en ATG18 (Cebollero and Reggiori, 2009; Chen and Klionsky, 2011). En mamíferos, Ras/PKA regula negativamente la autofagia fosforilando a LC3 o activando a TORC1 (Chen and Klionsky, 2011).

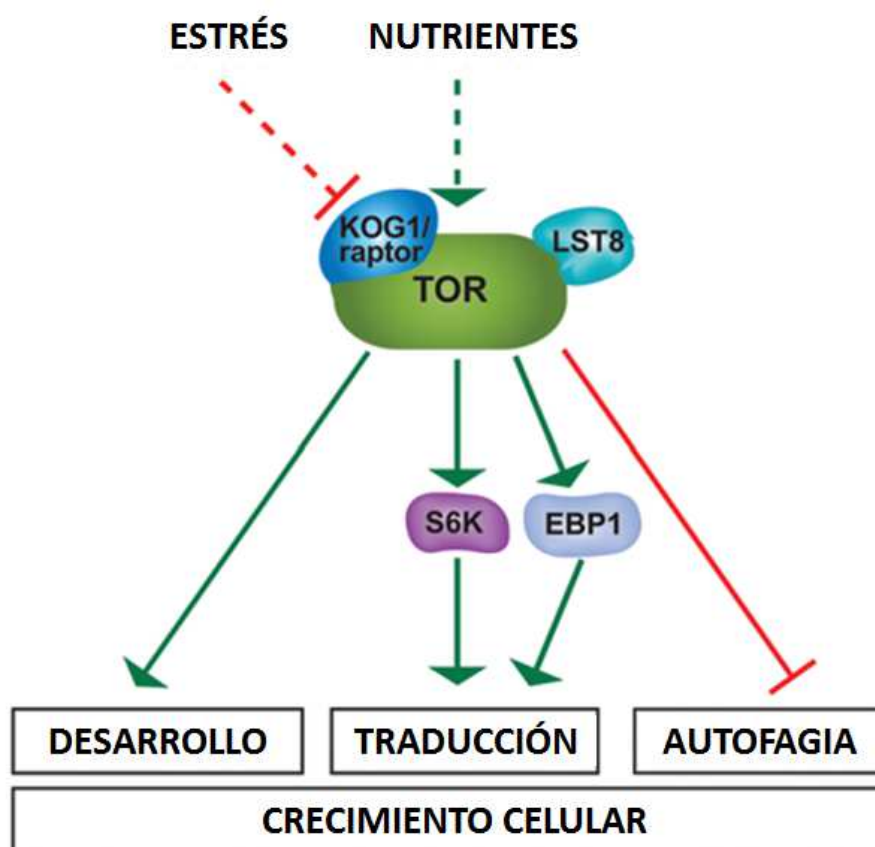
Otra vía de señalización implicada en la regulación de la autofagia es la de la quinasa Akt/PKB (Protein Kinase B) de mamíferos. Akt/PKB regula positivamente a mTORC1, por lo que actúa como regulador negativo de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011; Díaz-Troya et al., 2008b). Es importante destacar que mTORC2 activa a Akt/PKB, por lo que también regula la autofagia negativamente (Jung et al., 2010), como se ha mencionado anteriormente.

El homólogo en levaduras de Akt/PKB es la quinasa Sch9, que participa en la detección de nutrientes y en la coordinación del crecimiento celular (Cebollero and Reggiori, 2009). Sch9 regula la autofagia negativamente, al igual que su homólogo de mamíferos, aunque parece que puede hacerlo a nivel transcripcional (He and Klionsky, 2009).



**Figura 11:** Representación esquemática de los mecanismos que regulan la autofagia en levaduras. Las flechas azules indican activación, mientras que las líneas rojas indican inhibición. Para más detalles ver texto.

En organismos fotosintéticos también se han encontrado homólogos a las quinasas Sch9 de levaduras. En concreto, en el genoma de *Arabidopsis* se han identificado dos genes, denominados *S6K1* y *S6K2* (Bogre et al., 2003). Las proteínas S6K de plantas parecen ser dianas directas de TOR (Mahfouz et al., 2006) y actúan regulando la traducción (Long et al., 2004). Se ha propuesto que la proteína EBP1 (ErbB-3 EGF Receptor Binding Protein), implicada en el ensamblaje de proteínas (Horvath et al., 2006), es también diana de TOR en *Arabidopsis* (Deprost et al., 2007).



**Figura 12:** Representación esquemática de la vía TOR en organismos fotosintéticos. Adaptado de Díaz-Troya et al., 2008b.

Por otro lado, la quinasa AMPK (AMP-activated protein kinase) de mamíferos se activa en respuesta a un aumento en los niveles celulares de AMP debido a falta de nutrientes (Fimia and Piacentini, 2010; Jung et al., 2010). AMPK actúa como modulador positivo de la autofagia a través de tres mecanismos. En primer lugar, AMPK fosforila a Raptor, inhibiendo la vía de señalización mTORC1. En segundo lugar, AMPK activa a reguladores negativos de mTORC1, inhibiendo de nuevo dicha vía de señalización. Por último, AMPK fosforila y activa a ULK1, que a su vez inhibe a mTORC1 (Dunlop and Tee, 2014).

Snf1 (Sucrose non-fermenting 1), el homólogo en levaduras de AMPK, actúa también como regulador positivo de la autofagia a través de la regulación de ATG1 (He and Klionsky, 2009). Además, Snf1 también parece regular la autofagia a nivel transcripcional (Cebollero and Reggiori, 2009). Al contrario de lo que ocurre en mamíferos, Snf1 se encuentra regulado negativamente por TORC1 (Chen and Klionsky, 2011).

Por último, la quinasa PI3K (Phosphoinositide 3-kinase), ampliamente conservada en eucariotas (Jung et al., 2010), también ha sido descrita como un regulador importante de la autofagia. En mamíferos existen tres complejos PI3K distintos: PI3KI, PI3KII y

PI3KIII. El complejo PI3KIII está formado por la quinasa PI3K junto a las proteínas p150, ATG14 y Beclin1. Este complejo parece ser un modulador positivo de la autofagia esencial para su inducción (Chen and Klionsky, 2011).

En levaduras, existen dos complejos PI3K. El complejo PI3KI es el que está implicado en la regulación de la autofagia y está compuesto por la quinasa Vps34 (Vacuolar protein sorting 34), ATG6 (o Vps30), ATG14 y Vps15 (Chen and Klionsky, 2011). Este complejo controla la autofagia en respuesta a nutrientes, produciendo la acumulación de PI3P (Phosphatidylinositol 3-phosphate) en sitios específicos de la célula. A través de la unión con el PI3P, regula la unión de las proteínas ATG al PAS (He and Klionsky, 2009).

Hasta el momento, todas estas vías de señalización implicadas en la regulación de la autofagia en mamíferos y levaduras han sido poco estudiadas en organismos fotosintéticos. Por ello, no se dispone de más información acerca de estos mecanismos de regulación en plantas o microalgas, aunque cabe esperar que existan vías de regulación homólogas o similares en estos organismos.

#### **1.4.2 Mecanismos de regulación postraducciona.**

Las modificaciones postraduccionales de distintas proteínas ATG juegan un papel crucial en la regulación de la autofagia. De hecho, la iniciación de la autofagia depende de la fosforilación del complejo ATG1 (Cebollero and Reggiori, 2009), como ya se ha mencionado. Por otro lado, la modificación tipo ubiquitina de los complejos ATG8 y ATG12 es esencial para la formación de los autofagosomas. Pero además de estas modificaciones, existen otros mecanismos de regulación postraducciona implicados en la modulación de la autofagia (He and Klionsky, 2009). Las proteínas ATG pueden sufrir distintos tipos de modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, la acetilación, la ubiquitinación o la glicosilación (Wani et al., 2015).

La fosforilación de proteínas ATG es el mecanismo de regulación postraducciona más estudiado. Ya se ha mencionado en el apartado anterior la regulación del complejo ATG1 mediante fosforilación por parte de TORC1, cuya actividad también depende de su estado de fosforilación. Además, AMPK y Akt también regulan la autofagia mediante fosforilación. Por otro lado, se ha demostrado que la proteína ATG9 se regula por fosforilación mediada por ATG1 en levaduras, siendo esta necesaria para la formación de los autofagosomas (Papinski et al., 2014). De hecho, la fosforilación de ciertas proteínas ATG es esencial para su incorporación al PAS (Mao et al., 2013). En mamíferos se ha demostrado que ATG8 se regula por fosforilación, de forma que cuando se fosforila se inhibe su lipidación e incorporación a la membrana del autofagosoma, inhibiendo la autofagia (Cherra et al., 2010; Jiang et al., 2010).

La acetilación de los residuos de Lisina es un mecanismo de regulación esencial para la autofagia, actuando a distintos niveles. Por un lado, bajo condiciones de limitación de



nutrientes se produce una acetilación generalizada de las proteínas citoplasmáticas, que se asocia con un aumento de la autofagia (Eisenberg et al., 2014; Marino et al., 2014b). Por otro lado, la desacetilación de ciertas proteínas ATG es necesaria para que la autofagia pueda funcionar. En presencia de nutrientes, las proteínas ATG5, ATG7, ATG8 y ATG12 se encuentran acetiladas, mientras que se desacetilan cuando hay falta de nutrientes (He and Klionsky, 2009). Además, la acetilación y desacetilación de histonas también ha demostrado ser importante en la regulación de la autofagia (Fullgrabe et al., 2013).

La ubiquitinación de ciertas proteínas regula la actividad de la autofagia. En primer lugar, DEPTOR (regulador negativo de mTORC1) se ubiquitina en presencia de nutrientes, lo que impide su unión a mTORC1 de forma que la autofagia permanece inhibida (Zhao et al., 2011). Por otro lado, la ubiquitinación de ATG4 provoca su degradación, lo que afecta a LC3 y limita la autofagia (Kuang et al., 2012). Además, ULK1 también sufre ubiquitinación, aunque en este caso la ubiquitinación estabiliza el complejo y promueve la autofagia (Nazio et al., 2013).

Por último, se ha demostrado recientemente que la glicosilación también juega un papel en la regulación de la autofagia. En concreto, los reguladores de la autofagia AMPK, Akt y el complejo PI3K son dianas de N-acetilglucosilación (O-GlcNAcylation) (Bullen et al., 2014; Marsh et al., 2013; Wang et al., 2012).

#### **1.4.3 Regulación transcripcional y epigenética.**

Aunque los mecanismos de regulación postraduccional han sido los más estudiados hasta el momento, la autofagia se encuentra también finamente regulada a nivel transcripcional y epigenético (Fullgrabe et al., 2014), ya que una respuesta autofágica eficiente requiere la activación transcripcional de numerosos genes ATG (Cebollero and Reggiori, 2009).

Los factores FoxO (Forkhead box transcription factor class O) son factores de transcripción evolutivamente conservados que regulan la transcripción de varios genes de autofagia en distintas especies, mediante unión directa con sus promotores. Estos factores de transcripción actúan en paralelo a la vía de señalización TOR, es decir, la autofagia se regula al mismo tiempo por dos mecanismos distintos: la inhibición no transcripcional de TOR y la regulación transcripcional de los factores FoxO (Figura 7) (He and Klionsky, 2009). Además, cabe destacar que los factores FoxO modulan la autofagia también de forma no transcripcional cuando son exportados del núcleo (Fullgrabe et al., 2014).

En mamíferos, el factor de transcripción E2F1 (miembro de la familia de factores de transcripción E2F) se considera un regulador central de la autofagia, ya que muchas de sus dianas pertenecen a la maquinaria autofágica. Además, se ha comprobado que la

activación de este factor induce la autofagia. El gen BNIP3, que actúa como modulador positivo de la autofagia, es una diana del factor E2F1. Por otro lado, el factor de transcripción NF-κB (nuclear factor-κB) silencia a BNIP3 uniéndose a su promotor. Por tanto, la competición entre E2F1 y NF-κB por unirse al promotor de BNIP3 constituye un mecanismo para regular la respuesta autofágica (Fullgrabe et al., 2014).

Además, existen otros factores de transcripción implicados en la regulación de la autofagia en mamíferos. Por ejemplo, el factor TFEB actúa como modulador positivo de la autofagia mientras que el factor ZKSCAN3 lo hace como inhibidor. Cabe destacar el papel del supresor tumoral p53, que regula la autofagia de forma dual. La proteína p53 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma, desarrollando distintas funciones según su localización. Por un lado, p53 nuclear inhibe a mTOR y promueve la autofagia por activación transcripcional de ciertos genes. Por otro lado, p53 citoplasmática inhibe la autofagia (Fullgrabe et al., 2014).

En levaduras, los factores de transcripción Gln3 y Gcn4 regulan la transcripción de *ATG14* (que forma parte del complejo PI3K) en respuesta a la disponibilidad de nutrientes. Además, Gcn4 participa en la inducción de *ATG1* y *ATG13* en condiciones de carencia de aminoácidos. Estos factores de transcripción se encuentran regulados negativamente por TOR (Figura 7), que fosforila a los propios factores o bien a sus inhibidores para mantenerlos unidos en el citoplasma. La inactivación de TOR por rapamicina o limitación de nitrógeno produce la desfosforilación de estos factores y/o de sus inhibidores, lo que permite su transporte al núcleo y que activen la transcripción de genes *ATG* (Cebollero and Reggiori, 2009; Fullgrabe et al., 2014).

Finalmente, la autofagia se encuentra regulada a nivel epigenético ya que se ha demostrado que la inhibición de deacetilasas de histonas (HDACs: histone deacetylases) conduce a la activación de la autofagia en levaduras y mamíferos. Por tanto, las HDACs y las HATs (histone acetyltransferases) se consideran moduladoras de la autofagia (Fullgrabe et al., 2014). Además, errores en la regulación epigenética de la autofagia se asocian con condiciones patológicas (He and Klionsky, 2009). Cabe destacar el papel de la histona H3, cuyo estado de fosforilación y metilación ha sido relacionado con el control de la autofagia (Fullgrabe et al., 2014).

#### **1.4.4 Regulación de la autofagia por ROS.**

La conexión entre la autofagia y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) ha sido investigada de forma intensiva en distintos organismos, y se ha demostrado que la producción nociva de ROS induce este proceso degradativo. La autofagia es un proceso necesario para responder al daño causado por el estrés oxidativo; no obstante, ROS también actúa como señalizador en la regulación de la autofagia (Chen and Klionsky, 2011; Sciarretta et al., 2015). De hecho, las condiciones que regulan la actividad de la autofagia se asocian con cambios en los niveles celulares de ROS (Lee et

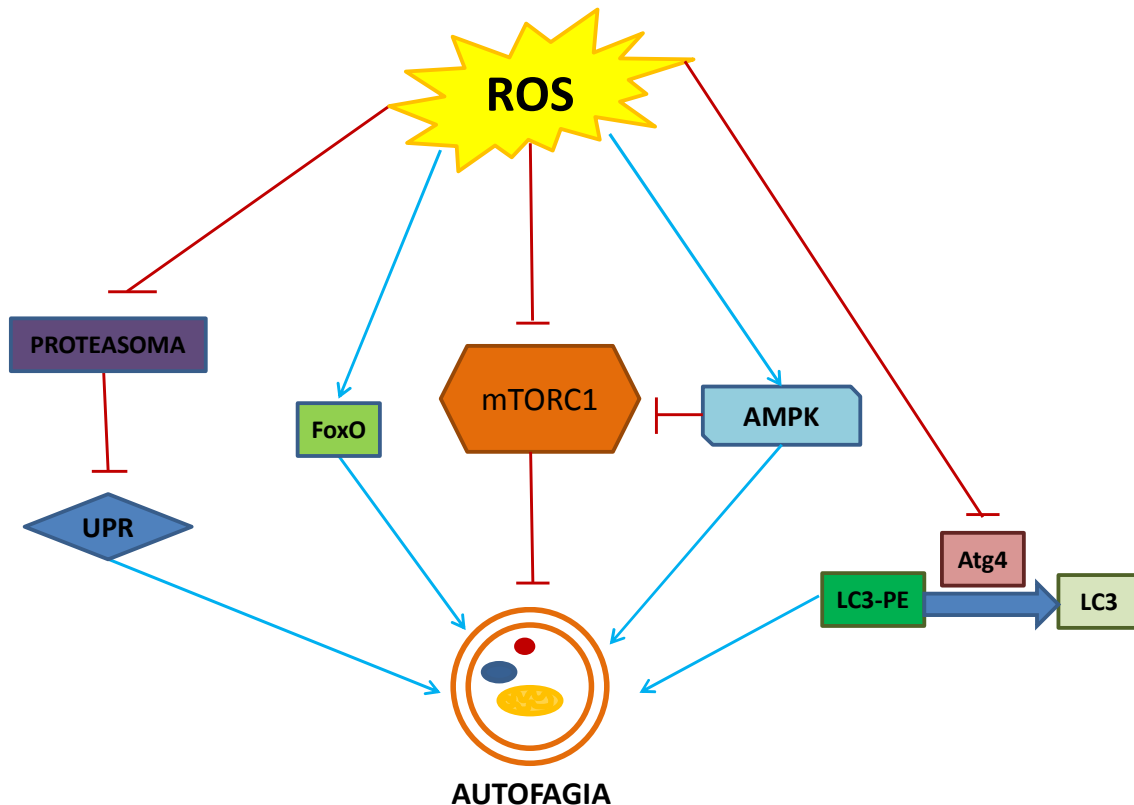
al., 2012). Además, cada vez existen más evidencias en mamíferos de que el estrés oxidativo modula la autofagia en respuesta a otros tipos de estrés celular (Dodson et al., 2013; Navarro-Yepes et al., 2014; Wen et al., 2013).

Durante el metabolismo celular, la reducción incompleta del oxígeno da lugar a distintas formas de ROS, que pueden ser generadas en la mitocondria, en el cloroplasto de los organismos fotosintéticos, en el retículo endoplasmático o bien vía NADPH oxidasas, entre otras localizaciones. Las formas de ROS más importantes biológicamente son el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), ya que son moléculas señalizadoras que pueden ser generadas de forma controlada en las células (Lee et al., 2012).

En cuanto al origen del ROS implicado en la regulación de la autofagia, existe más de una posibilidad que además dependerá del estrés y del tipo celular. Por ejemplo, la producción de ROS mitocondrial ha demostrado jugar un papel importante en la inducción de la autofagia en humanos (Chen et al., 2009).

Las NADPH oxidasas, también conocidas como Nox, son enzimas que se localizan en la membrana celular y que generan ROS, en concreto ion óxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Existen distintas isoformas con distintas funciones, pero se ha demostrado que ROS producido por NADPH oxidasas promueve la autofagia en distintos tipos celulares (Sciarretta et al., 2015). Por ejemplo, la actividad NADPH oxidasa en mamíferos participa en la inducción de autofagia en respuesta a patógenos y a estrés en el retículo endoplasmático (Lee et al., 2012).

No obstante, se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares por los que ROS puede mediar en la regulación de la autofagia. Se ha demostrado en mamíferos que la oxidación de mTOR provoca la inhibición de su actividad, lo cual permite la inducción de la autofagia. Además, ROS estimula la vía AMPK, que activa la autofagia (Chen and Klionsky, 2011; He and Klionsky, 2009).



**Figura 13:** Representación esquemática de los mecanismos que regulan la autofagia en respuesta a ROS. Las flechas azules indican activación, mientras que las líneas rojas indican inhibición. Para más detalles ver texto.

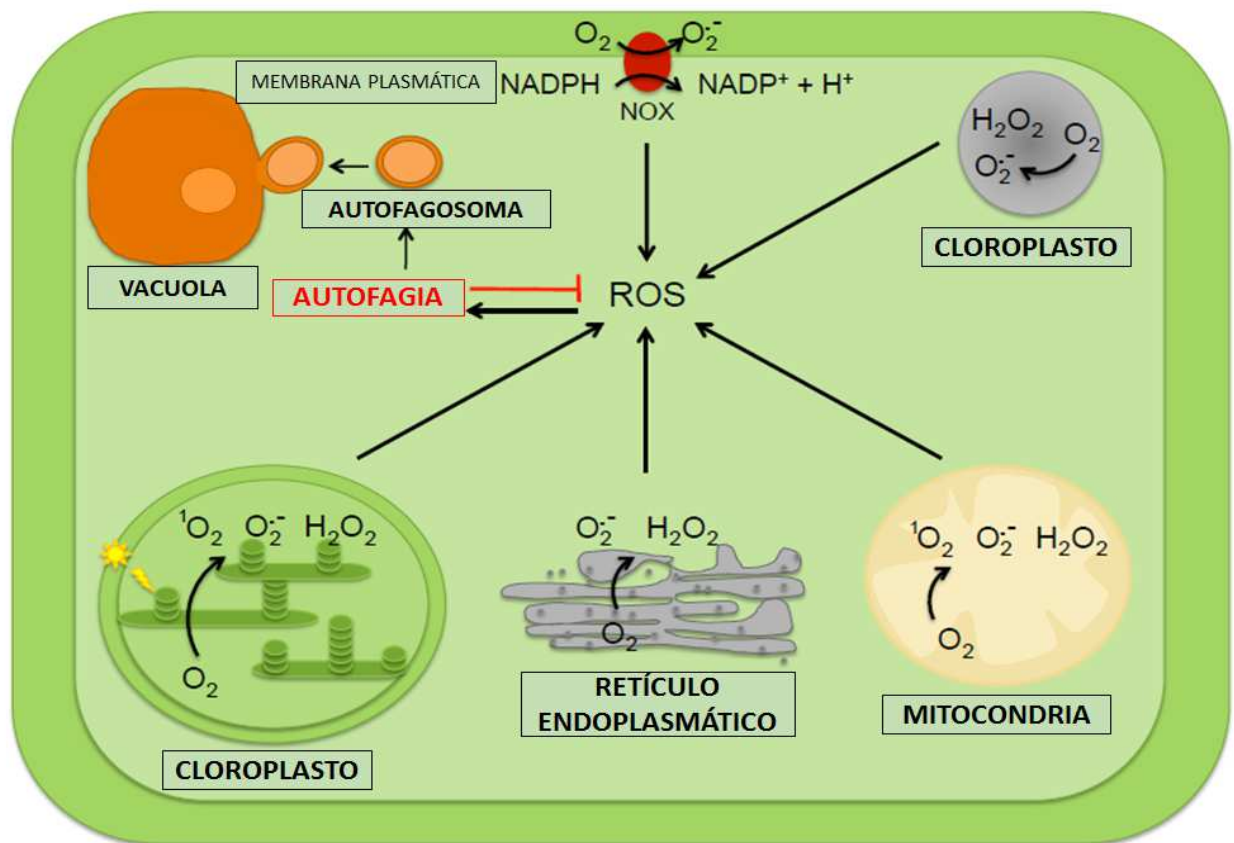
En tercer lugar, ROS puede estimular la autofagia mediante oxidación de compuestos de su maquinaria. Así, la proteasa ATG4 (necesaria para la lipidación de ATG8/LC3 y por tanto esencial para el proceso de autofagia) se encuentra regulada por un mecanismo redox en mamíferos. Se ha demostrado que una de las cisteínas de ATG4 se oxida mediante ROS, lo que regula su actividad (Scherz-Shouval et al., 2007). La forma oxidada de ATG4 tiene inhibida su actividad proteasa, de forma que se previene la disociación prematura del conjugado ATG8-PE de la membrana del autofagosoma (Chen and Klionsky, 2011; He and Klionsky, 2009; Lee et al., 2012; Sciarretta et al., 2015; Scherz-Shouval et al., 2007). Hasta el momento, ATG4 es la única proteína de la maquinaria de autofagia cuya actividad ha sido demostrada que tiene una clara regulación redox. Recientemente, se ha demostrado en levaduras el mecanismo molecular mediante el cual la proteína Atg4 es regulada por ROS (Perez-Perez et al., 2014). Se han identificado dos residuos de cisteína ampliamente conservados en eucariotas que establecen un puente disulfuro en la proteína ATG4 de levaduras. La oxidación-reducción de dicho puente disulfuro regula la actividad proteolítica de Atg4. Además, se ha demostrado que este puente disulfuro puede ser eficientemente reducido por la tiorredoxina *h*, siendo la primera vez que esta oxidoreductasa ha sido relacionada con la regulación de la autofagia (Perez-Perez et al., 2014).

#### 1.4.4.1 Regulación de la autofagia por ROS en organismos fotosintéticos.

En los organismos fotosintéticos existe una elevada producción de ROS como consecuencia de la producción de  $O_2$  durante la fotosíntesis que tiene lugar en el cloroplasto. La cadena de transporte electrónico fotosintética tiene como subproductos peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), singlete de oxígeno ( $^1O_2$ ) y radicales hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ). Además, las mitocondrias, los peroxisomas y las NADPH oxidasas también son fuente de ROS en plantas y algas (Perez-Perez et al., 2012b). El estrés oxidativo y los estímulos que aumentan la producción de ROS en organismos fotosintéticos también activan la autofagia (Perez-Perez et al., 2012a; Pérez-Pérez et al., 2010; Perez-Perez et al., 2012b; Xiong et al., 2007).

Las NADPH oxidasas juegan un papel central en plantas, integrando señales redox que participan en la mediación de distintos procesos (Foreman et al., 2003; Lherminier et al., 2009; Miller et al., 2009). También se ha relacionado la actividad NADPH oxidasa con la inducción de la autofagia en plantas, siendo necesario ROS generado vía NADPH oxidasa para la activación de la autofagia en respuesta a estrés nutricional o salino (Liu et al., 2009). Por otro lado, cabe destacar que el sulfuro citosólico ha sido recientemente identificado como un regulador negativo de la autofagia en *Arabidopsis* aunque el mecanismo molecular mediante el cual el sulfuro podría controlar este proceso degradativo es aún desconocido (Alvarez et al., 2012).

En microalgas existe una relación funcional entre ROS y autofagia (Pérez--Pérez and Crespo, 2014), que sugiere que las NADPH oxidasas también podrían participar en la activación de la autofagia en estos organismos. De hecho, se ha demostrado que las NADPH oxidasas participan en la inducción de autofagia en células de *Chlamydomonas* sometidas a deficiencia de carotenoides, lo que genera un daño foto-oxidativo en la célula (Perez-Perez et al., 2012a).



**Figura 14:** Regulación de la autofagia por ROS en *Chlamydomonas*. Imagen adaptada de Perez-Perez et al., 2012.

La regulación de la autofagia por oxidación de TOR o de ATG4 no ha sido demostrada hasta el momento en organismos fotosintéticos, aunque dado el alto grado de conservación evolutiva del proceso, es probable que estos mecanismos de regulación se encuentren también conservados (Perez-Perez et al., 2012b).

### 1.5 Retículo endoplasmático.

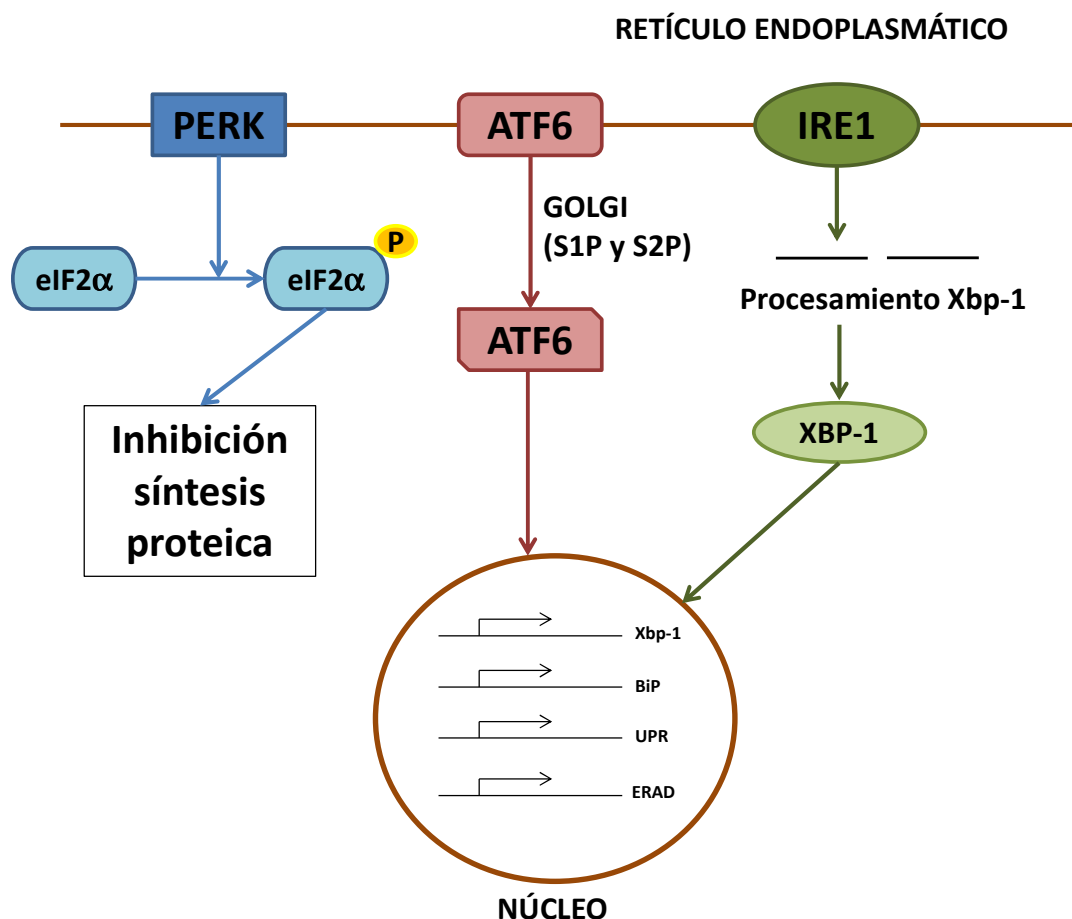
El retículo endoplasmático (RE) es un orgánulo formado por túbulos, vesículas y cisternas interconectados entre sí (Chaudhari et al., 2014). Es el orgánulo celular encargado de las modificaciones postraduccionales de las proteínas, desde el plegamiento (llevado a cabo por chaperonas residentes) y la oligomerización proteica hasta la glicosilación y formación de puentes disulfuro (Chen and Yin, 2011). Además, participa en el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y en la biosíntesis de lípidos (Chaudhari et al., 2014; Nakka et al., 2014; Zhang, 2010).

### 1.5.1 Estrés en el retículo endoplasmático.

El estrés en el RE es un potente inductor de la autofagia (Yorimitsu et al., 2006), como se ha mencionado anteriormente. Por ello, durante la presente Tesis Doctoral se ha intentado esclarecer la relación entre el estrés en el retículo endoplasmático y la autofagia en organismos fotosintéticos empleando *Chlamydomonas* como sistema modelo.

Cuando se produce una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente en el retículo endoplasmático, de forma que la cantidad de proteínas desplegadas o mal plegadas supere la capacidad del orgánulo para procesarlas, se genera lo que se conoce como estrés en el retículo endoplasmático (Gardner et al., 2013). Para responder a este estrés, las células activan lo que se conoce como respuesta UPR (Unfolded Protein Response), mediada en mamíferos por PERK, ATF6 e IRE1 (Chen and Yin, 2011).

En respuesta a estrés en el retículo endoplasmático, PERK fosforila el factor eIF2 $\alpha$ , de forma que inhibe el ensamblaje del ribosoma 80S y, por tanto, inhibe la traducción para reducir la entrada de proteínas al orgánulo. ATF6 se transloca al aparato de Golgi, donde es procesada por S1P y S2P (site 1 and site 2 proteases), para generar la forma madura que migra al núcleo y activa la transcripción de la chaperona BiP y del factor de transcripción XBP-1. IRE1 activa el procesamiento del mRNA de *Xbp-1*, que a su vez activa la transcripción de chaperonas del retículo y de genes implicados en la respuesta UPR y en la vía ERAD (Chaudhari et al., 2014; Chen and Yin, 2011; Nakka et al., 2014; Ogata et al., 2006).



**Figura 15:** Representación esquemática de la UPR en mamíferos.

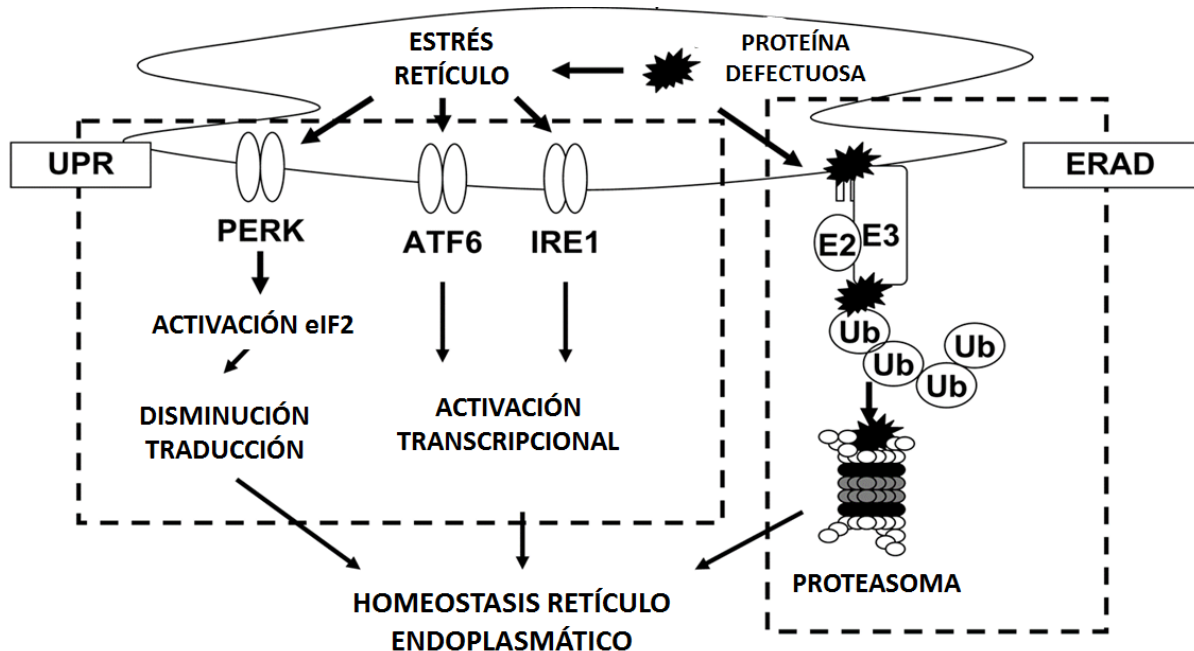
Por tanto, la respuesta UPR inhibe la expresión de proteínas al mismo tiempo que activa la síntesis de chaperonas y distintas vías de degradación, con el objetivo de aliviar el estrés en el retículo endoplasmático y recuperar su homeostasis. No obstante, si el estrés en el retículo endoplasmático es severo y persistente, la respuesta UPR se convierte en un mecanismo proapoptótico y se activan las vías de muerte celular (Walter and Ron, 2011).

En levaduras, la respuesta UPR está dirigida únicamente por Ire1. En respuesta a estrés en el retículo endoplasmático, Ire1 es activado y procesa el mRNA de *HAC1*. Este procesamiento genera un factor de transcripción funcional (Hac1) que induce la expresión de genes implicados en la respuesta UPR. Cabe destacar que la vía Ire1-Hac1 está envuelta en la inducción de autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático en levaduras (Cebollero et al., 2012; Yorimitsu and Klionsky, 2014).

En plantas, sólo se han identificado las vías IRE1 y ATF6 de la respuesta UPR. IRE1 de plantas procesa el mRNA de *bZIP60*, generando un factor de transcripción que se transloca al núcleo e induce la transcripción de genes de UPR (Ruberti et al., 2015). Por otro lado, ATF6 de plantas también es translocado al aparato de Golgi en respuesta a



estrés en el retículo, es cortado por S1P y S2P, y finalmente induce la transcripción de genes implicados en señalización UPR en el núcleo (Wan and Jiang, 2015). Al igual que en mamíferos y levaduras, IRE1 está implicado en la inducción de autofagia por estrés en el retículo endoplasmático en plantas (Liu and Bassham, 2013).



**Figura 16:** Respuesta a estrés en el retículo endoplasmático. UPR: Unfolded Protein Response. ERAD: Endoplasmic Reticulum Associated Degradation. Para más detalles ver texto. Imagen adaptada de Yamasaki et al., 2005.

Por otro lado, y en paralelo a la respuesta UPR, el estrés en el retículo endoplasmático activa la vía ERAD (ER Associated Degradation). Esta vía consiste en la retrotranslocación de proteínas plegadas incorrectamente del retículo al citoplasma, donde son degradadas por el proteasoma. Así, la vía ERAD contribuye también a aliviar el estrés en el retículo endoplasmático (Yamasaki et al., 2005; Yorimitsu and Klionsky, 2014). No obstante, la vía ERAD no es capaz de degradar sustratos grandes, como agregados proteicos u orgánulos dañados, por lo que las células necesitan un mecanismo de degradación robusto para responder al estrés en el retículo endoplasmático, como es la autofagia (Cebollero et al., 2012).

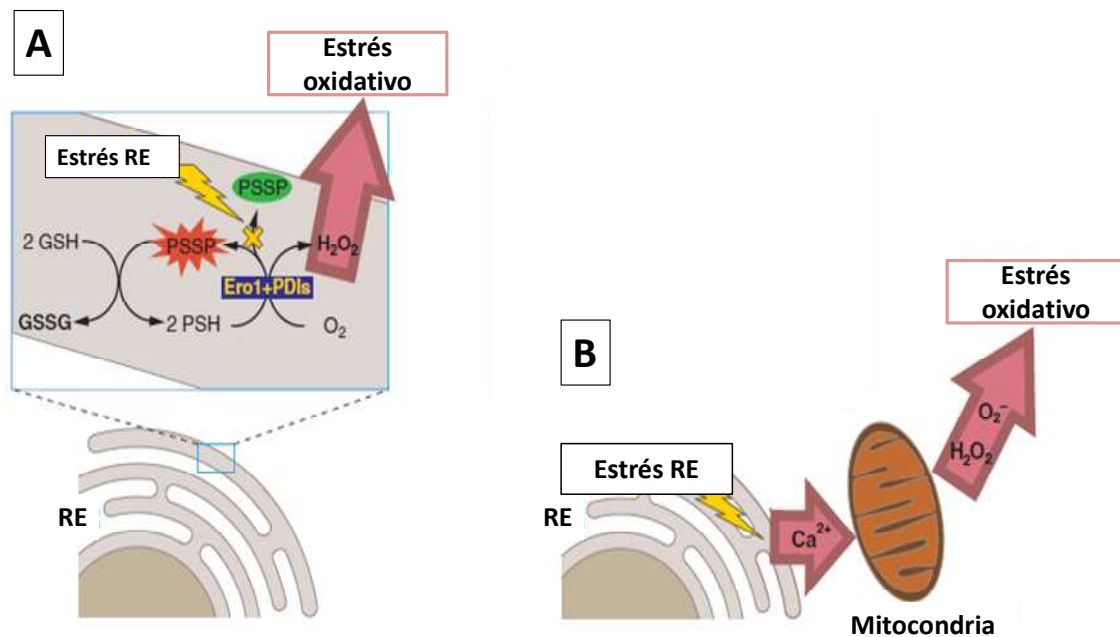
El estrés en el retículo endoplasmático induce la autofagia como mecanismo para aliviar el estrés y favorecer la supervivencia celular (Ogata et al., 2006; Yorimitsu and Klionsky, 2014), ya que la autofagia contribuye a la eliminación de proteínas no plegadas correctamente y de orgánulos dañados (Deegan et al., 2015). Junto con la autofagia, se induce el sistema del proteasoma o UPS (Ubiquitin-Proteasome System), que también participa en la degradación de proteínas (Chen and Yin, 2011).

Finalmente, cuando se produce estrés en el retículo endoplasmático, el orgánulo cambia morfológicamente y se expande de forma masiva, gracias a lo cual aumenta el espacio dedicado al plegamiento proteico y se reduce la concentración de proteínas plegadas incorrectamente. La autofagia participa en este proceso segregando y degradando parte del retículo, con objeto de mantener su homeostasis (Bernalet et al., 2006).

### **1.5.2 Conexión entre estrés en el retículo endoplasmático y estrés oxidativo.**

El retículo endoplasmático presenta en su interior un ambiente altamente oxidante, apropiado para el plegamiento proteico. Así, con un ratio GSH/GSSG hasta 100 veces menor que en el citoplasma (Montero et al., 2013) se favorece la formación de puentes disulfuro. Como consecuencia de la formación de puentes disulfuro, el plegamiento de las proteínas genera como subproducto ROS en el lumen del retículo endoplasmático. La enzima PDI (Protein Disulfide Isomerase) es la encargada de formar los puentes disulfuro dentro de dicho orgánulo. La forma oxidada de dicha proteína es la enzima activa, que se reduce al formar un puente disulfuro. ERO1 (ER Oxidoreductin 1) se encarga de regenerar PDI oxidada, y lo hace transfiriendo electrones de la PDI reducida al oxígeno molecular, generando de esta forma peróxido de hidrógeno (Ramming et al., 2015) (Figura 17).

Por otro lado, cuando se produce un puente disulfuro erróneo, el GSH presente en el retículo lo reduce, lo que contribuye a mantener un nivel bajo de GSH en el lumen del retículo (Kincaid and Cooper, 2007). Por tanto, el estrés en el retículo endoplasmático genera estrés oxidativo. Por ello, la respuesta a estrés en el retículo incluye también una respuesta a estrés oxidativo. Además, la mitocondria también parece jugar un papel en la formación de ROS cuando se produce un estrés en el retículo endoplasmático. La mitocondria detecta el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, provocado por la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  por parte del retículo, lo que estimula la producción de ROS por parte de la mitocondria (Appenzeller-Herzog, 2011; Deniaud et al., 2008).



**Figura 17:** Inducción de estrés oxidativo por estrés en el retículo endoplasmático (Appenzeller-Herzog, 2011). A: Generación de estrés oxidativo debido a la formación de puentes disulfuro dentro del retículo endoplasmático. B: Generación de estrés oxidativo a causa de la liberación de Ca<sup>2+</sup> por parte del retículo endoplasmático, que estimula la producción mitocondrial de ROS.

## 1.6 Metales pesados.

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos con alta densidad, que resultan altamente tóxicos para los organismos vivos. Estos metales se caracterizan por poseer una elevada masa atómica y una densidad al menos 5 veces mayor que la del agua (5g/cm<sup>3</sup>). Son elementos no biodegradables, por lo que la contaminación con metales supone hoy en día un gran problema medioambiental (Devriese et al., 2001; Emamveridian et al., 2015). Parte de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en estudiar la respuesta a la toxicidad inducida por metales pesados en *Chlamydomonas*.

### 1.6.1 Toxicidad inducida por metales pesados.

Los metales impiden el funcionamiento normal de los procesos metabólicos, por lo que provocan toxicidad en todos los sistemas estudiados. En mamíferos, la toxicidad inducida por metales pesados se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas (Badrack and Jones, 2011). En plantas, los metales pesados causan clorosis (insuficiencia de clorofila) (Baryl et al., 2001) e inhibición del crecimiento de las raíces (Horst et al., 2010; Woolhouse, 1983), entre otros efectos.

Los metales pesados forman enlaces con los grupos sulfhidrilo de las proteínas, afectando a su estructura y funcionalidad. Además, interactúan con los grupos funcionales de algunas moléculas. También afectan a la integridad de las membranas (Peixoto et al., 2001), lo que genera problemas en la fotosíntesis y en la respiración. Por otro lado, aunque las proteínas que utilizan metales como cofactor han evolucionado para explotar las propiedades de un metal específico, un metal es capaz de sustituir a otro con características similares (“mismetallation”), provocando la pérdida de funcionalidad de la proteína (Blaby-Haas and Merchant, 2014).

Por tanto, los organismos han desarrollado sistemas para defenderse de la toxicidad inducida por los metales pesados. Como mecanismo para evitar la entrada de los metales, las plantas realizan simbiosis con micorrizas, que actúan como barreras. Por otro lado, las fitoquelatinas son polímeros de glutatión que quelan a los metales para evitar su interacción con otras moléculas. Las fitoquelatinas han sido identificadas en plantas, microalgas, levaduras, hongos y algunos animales (Bundy et al., 2014; Vatamaniuk et al., 2001; Zagorchev et al., 2013). Otras moléculas que actúan como quelantes son las metalotioneínas. Estas proteínas citoplasmáticas, que se unen a los iones metálicos para capturarlos, se han encontrado en organismos procariotas, hongos, invertebrados, mamíferos y plantas (Beg et al., 2015; Jia et al., 2012; Kagi and Valee, 1960; Oliveira et al., 2015; Yang et al., 2015).

Las plantas y las levaduras secuestran los metales en la vacuola para evitar que interactúen con otros elementos celulares. Las microalgas y amebas acumulan ciertos metales en acidocalcisomas, mientras que hongos y mamíferos lo hacen en zincosomas (Blaby-Haas and Merchant, 2014).

Existen metales esenciales, necesarios en pequeñas cantidades (micronutrientes) para los organismos, que se convierten en tóxicos a altas concentraciones. Por otro lado, también hay metales no esenciales que son tóxicos incluso a bajas concentraciones. Por ejemplo, el Ni y el Cu son metales esenciales, que forman parte de algunas enzimas (Stern, 2010; Yusuf et al., 2011). Por el contrario, el Cd y el Hg no presentan ninguna función biológica y, por tanto, no son esenciales.

Centrándonos en los micronutrientes, cabe destacar el caso del Ni. Este metal presenta varios estados oxidativos, aunque su estado divalente ( $\text{Ni}^{2+}$ ) es el más estable en los sistemas biológicos. El Ni forma parte de algunas enzimas, como la hidrogenasa, la glioxalasa y la ureasa, que participa en el metabolismo del nitrógeno (Quinn et al., 2003). En plantas se ha demostrado que el Ni compite con el Fe (hierro) y con el Zn (zinc), ya que previene su absorción por parte de la planta y causa deficiencia de estos metales. En *Chlamydomonas*, es de gran relevancia el estudio de la toxicidad provocada por Ni, ya que se utiliza ampliamente el promotor del gen *CYC6* (citocromo c6) para la expresión de proteínas. Este promotor inducible se activa en deficiencia de Cu (cobre), o en presencia de Ni (níquel) o Co (cobalto) (Quinn et al., 2003), y requiere la acción del factor de transcripción CRR1 (Copper Response Regulator 1) (Sommer et al., 2010). La inducción del promotor mediante adición de Ni es una de las estrategias

más utilizadas. No obstante, el Ni causa toxicidad a altas concentraciones (Ferrante et al., 2008), aunque sus mecanismos de acción son poco conocidos.

El Cu es otro micronutriente, que participa en múltiples procesos fisiológicos, ya que actúa como transportador de electrones y como catalizador de reacciones redox (Quinn et al., 2003). Las plantas asimilan el Cu en su forma divalente ( $\text{Cu}^{2+}$ ), aunque en exceso afecta a la permeabilidad de las raíces (Berglund et al., 2002) y desestructura las membranas tilacoidales (Patsikka et al., 2002). En *Chlamydomonas*, el exceso de Cu inhibe el crecimiento (Mosulen, 2003) y reduce la asimilación de nitrógeno por parte de las células (Devriese et al., 2001).

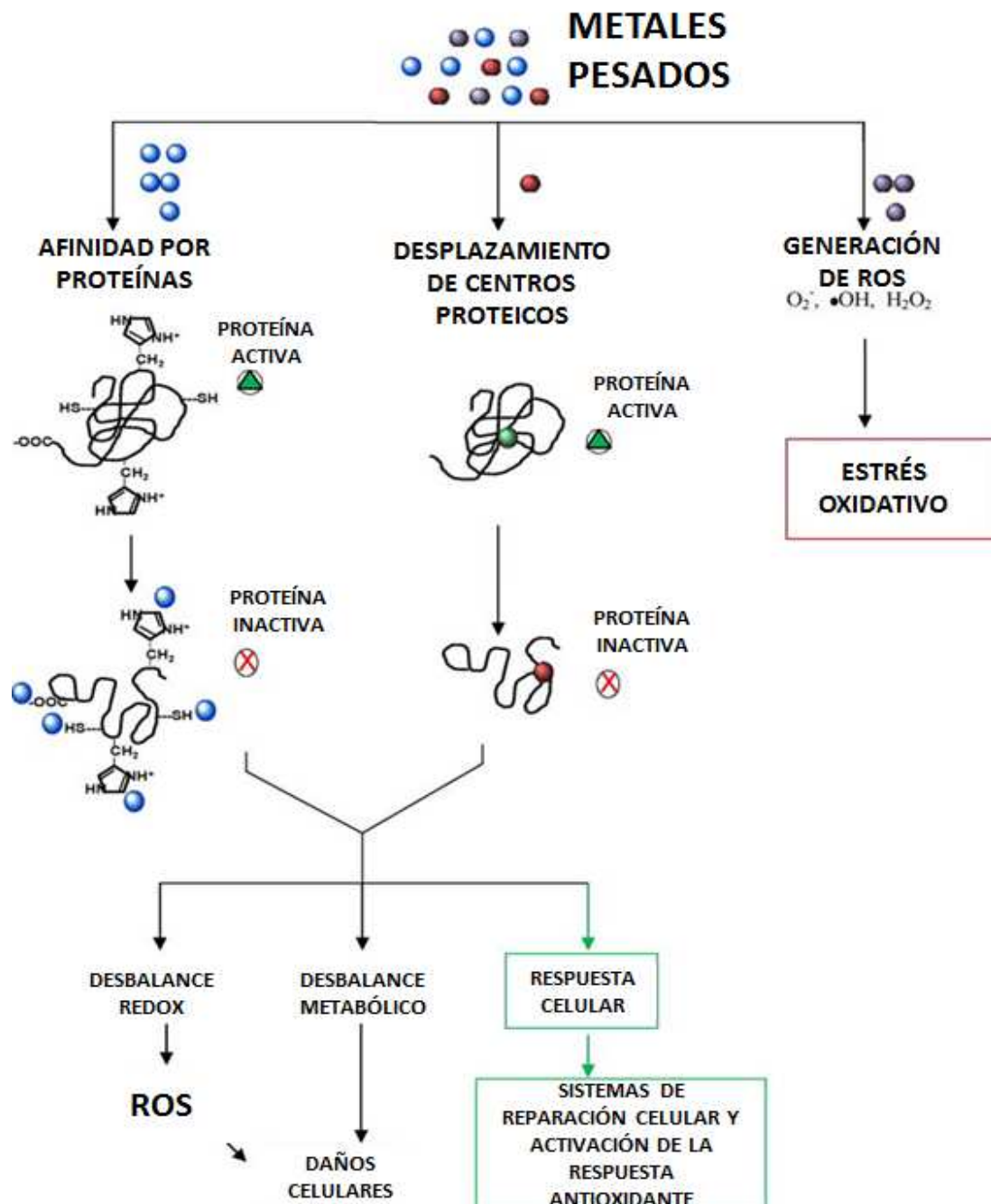
Entre los metales no esenciales, cabe destacar el caso del Cd que ha sido estudiado en la presente Tesis. Se ha demostrado que este metal entra en las células de las plantas a través de los canales de calcio, perturbando el estado hídrico de la planta y causando marchitez (Perfus-Barbeoch et al., 2002). En mamíferos, el Cd también interacciona con los canales de calcio, además de unirse a las proteínas sinápticas mimetizando a dicho metal (Marchetti, 2013). En *Chlamydomonas*, se ha comprobado que el Cd reduce el crecimiento celular y el contenido en carbono y nitrógeno, mientras que aumenta el contenido en sulfuro (Mosulen, 2003). También inhibe la actividad fotosintética de la microalga, acumulándose en el cloroplasto (Mosulen, 2003). Además, provoca activación de la glutamato deshidrogenasa, que sintetiza el glutamato necesario para la síntesis de fitoquelatinas (Devriese et al., 2001; Domínguez et al., 2003). Las nanopartículas de Cd inhiben el proteasoma en *Chlamydomonas*, lo que contribuye a su toxicidad (Simon et al., 2013).

El Hg es un metal no esencial y uno de los elementos más tóxicos de la tabla periódica (Carocci et al., 2014; Chen and Yang, 2012; Langford and Ferner, 1999; Li and Tse, 2015). Aunque existe en múltiples formas, la divalente ( $\text{Hg}^{2+}$ ) es la más común en los suelos y la que absorben las plantas, causando una inhibición de la fotosíntesis, perturbando el equilibrio hídrico y dificultando la asimilación de nutrientes (Chen and Yang, 2012). En *Chlamydomonas*, el Hg inhibe el crecimiento celular y reduce el contenido en clorofila de las células (Elbaz et al., 2010; Weiss-Magasic et al., 1997). Además, ha demostrado inhibir de forma transitoria el promotor del gen *CYC6*, lo que implica una interacción con la vía CRR1 (Sommer et al., 2010).

### **1.6.2 Conexión entre toxicidad inducida por metales y estrés oxidativo.**

Además de los mecanismos de toxicidad mencionados anteriormente, se ha demostrado en distintos sistemas que los metales generan ROS en las células, que a su vez conduce a oxidación de proteínas y lípidos, ataque oxidativo del DNA, desbalance redox y desestabilización de membranas. Los metales pueden generar ROS tanto directamente, por reacciones Haber-Weiss y Fenton o rompiendo la cadena transportadora de electrones del cloroplasto, como indirectamente, disminuyendo los

niveles de GSH, inhibiendo enzimas antioxidantes o induciendo enzimas productoras de ROS (Violante et al., 2010). Además, algunos metales forman parte de enzimas que catalizan reacciones redox, por lo que un exceso de metales puede resultar en reacciones redox incontroladas, que conducen a generación de ROS (Stoiber et al., 2013).



**Figura 18:** Toxicidad inducida por metales pesados en plantas. Imagen adaptada de Violante et al., 2010.

En algas, los metales provocan una disminución de los antioxidantes celulares (Stoiber et al., 2013), probablemente por generación de estrés oxidativo. En *Chlamydomonas*, el Hg provoca acumulación de ROS y peroxidación de moléculas (Elbaz et al., 2010; Wei et al., 2011). En este sentido, cabe mencionar que en el mutante *SOR1* (Singlet Oxygen Resistant 1) de *Chlamydomonas*, que muestra una mayor resistencia a estrés oxidativo, muestra unos niveles de expresión de genes de respuesta a metales alterados (Fischera et al., 2012), lo que sugiere una conexión entre la respuesta a metales con el estrés oxidativo.

## 2 OBJETIVOS

- 2.1 Estudiar la relación entre el estrés en el retículo endoplasmático con la activación de la autofagia en *Chlamydomonas reinhardtii*.
- 2.2 Investigar la activación de la autofagia por exposición a elevadas concentraciones de metales.
- 2.3 Estudiar la posible implicación del estrés oxidativo en la activación de la autofagia por estrés en el retículo endoplasmático o por exceso de metales.



### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Organismos y condiciones de cultivo.

##### 3.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii*.

###### 3.1.1.1 Estirpes utilizadas.

El organismo estudio de esta tesis es la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* y la estirpe utilizada es el mutante de pared celular cw15 4B+, obtenida del laboratorio de Jean-David Rochaix (Universidad de Ginebra, Suiza). Además, se han utilizado las estirpes mutantes *sor1* y *crr1-1*, obtenidas del *Chlamydomonas Culture Collection* (<http://chlamycollection.org/>). La estirpe mutante SATG8 se ha generado en la presente Tesis Doctoral, mediante transformación de la estirpe cw15 4B+ con un plásmido que contiene el cDNA del gen ATG8 de *Chlamydomonas* bajo el control del promotor del gen CYC6.

###### 3.1.1.2 Medios y condiciones de cultivo.

En condiciones normales, las células se cultivaron fotoheterotróficamente según lo descrito por Harris (1989) en luz continua ( $50-70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y a 25°C en agitación a 100 rpm utilizando medio TAP (con acetato como fuente de carbono). Para el cultivo en medio sólido, se solidificó el medio TAP con una concentración de 12 g/l de agar (Bacto-agar, Difco). La esterilización de los medios se llevó a cabo mediante autoclavado a 120°C y una atmosfera de sobrepresión durante 20 minutos.

Cuando fue necesario, células en fase de crecimiento exponencial ( $10^6$  cel/ml) fueron tratadas con 5  $\mu\text{g/ml}$  de tunicamicina (654380, Calbiochem) proveniente de un concentrado de 5 mg/ml en dimetilformamida, 2.5 mM de DTT (A2948, Applichem), 1mM de peróxido de hidrógeno (H1009, Sigma-Aldrich), 1  $\mu\text{M}$  de metilviológeno (85617-7, Sigma-Aldrich), 20 mM de norfluorazon (PS1044, Sigma-Aldrich), 5 ó 10 mM de GSH (G4251, Sigma-Aldrich), 2 mM de ascorbato (A5960-25G, Sigma Life Science), 1  $\mu\text{g/ml}$  de taptargina (SC-24017, Santa Cruz Biotechnology), de 15 a 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (K43334827, Millipore), de 50 a 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (A1033,0100 UN 3077, Applichem), de 50 a 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (A1034,0500, Applichem), de 25 a 150  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  (202908-10g Pcode: 1001378798, Sigma-Aldrich) o de 0.25 a 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{HgCl}_2$  (M-6529, Sigma-Aldrich). Los distintos compuestos se esterilizaron mediante filtración.

- ❖ **Medio TAP:** 20 ml/l de solución Beij 40X, 2.42 g/l de Tris, 1 mM de  $\text{KPO}_4$  pH 7 y 1 ml/l de solución de elementos traza. El pH se ajusta a 7 con ácido acético.
- ❖ **Solución Beij 40X:**  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a 16 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 2 g/l y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a 10 g/l. Se esteriliza en autoclave y se abre siempre en esterilidad para evitar su contaminación.
- ❖ **Solución de elementos traza:** En 550 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  se disuelven en el orden indicado los siguientes compuestos: 11.4 g de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 22 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.06 g de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 4.99 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1.61 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1.57 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 1.1 g de  $(\text{NH}_4)\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Se calienta la mezcla a  $100^\circ\text{C}$ . Por otro lado, se disuelven 50 g de  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  en 250 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  aportando calor y se añade a la primera solución. Se deja enfriar hasta  $80\text{-}90^\circ\text{C}$  y se ajusta el pH a 6.8 con KOH al 20 %. Se lleva el volumen hasta 1 litro y se mantiene a temperatura ambiente durante 2 semanas. Se filtra antes de su uso.

### 3.1.2 *Escherichia coli*.

#### 3.1.2.1 Estirpes utilizadas.

La estirpe de *E. coli* utilizada en esta tesis para la clonación de fragmentos de DNA fue la estirpe DH5 $\alpha$  ( $\alpha$  F<sup>-</sup>, endA1, hsdR17 ( $m_K^+$ ,  $r_K^-$ ) supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1,  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80-lacZ M15)) (HANAHAN, 1983) obtenida del servicio de cultivos del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis.

#### 3.1.2.2 Medios y condiciones de cultivo.

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó medio LB (Luria-Bertani). Para la preparación de medio sólido, se añadió agar a una concentración final de 15 g/l. Cuando fue necesario, el medio se suplementó con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina procedente de un concentrado a 100 mg/ml en metanol.

Los cultivos en medio líquido se mantuvieron en tubos o matraces Erlenmeyer de volumen cinco veces mayor al volumen de medio empleado, a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$  y a 200 rpm de agitación orbital continua, en un incubador New Brunswick Scientific modelo G25. El crecimiento en placas se realizó en estufas termostatzadas a  $37^\circ\text{C}$ .

- ❖ **Medio LB:** 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl.

### 3.2 Métodos de biología molecular.

#### 3.2.1 Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Los plásmidos utilizados en la presente Tesis Doctoral, así como sus características más importantes, se detallan en la siguiente Tabla:

Plásmido	Características	Referencia
<b>pSL18</b>	Plásmido de expresión en <i>Chlamydomonas</i> bajo el promotor del gen <i>psaD</i> . Confiere resistencia a paramomicina.	(Falciatore et al., 2005)
<b>pPCYC6</b>	Plásmido de expresión en <i>Chlamydomonas</i> bajo el promotor del gen <i>CYC6</i> . El promotor del gen <i>CYC6</i> se obtuvo mediante PCR usando los oligonucleótidos PCYC65'XhoI y PCYC63'NdeI, y se clonó en las dianas XhoI y NdeI de pSL18 sustituyendo al promotor del gen <i>psaD</i> . Confiere resistencia a paramomicina.	José Luis Crespo, resultados no publicados
<b>pMPM1</b>	Plásmido que expresa la proteína ATG8 de <i>Chlamydomonas</i> marcada con Estreptavidina en su extremo N-terminal bajo el promotor del gen <i>CYC6</i> . El gen <i>ATG8</i> marcado se obtuvo sintéticamente y se introdujo en la diana SpeI del plásmido pPCYC6.	Esta Tesis

**Tabla 1:** Plásmidos empleados en esta Tesis y sus características.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo para cuantificar expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa, sus secuencias y referencias se detallan en la siguiente Tabla:

Gen	Oligonucleótido	Secuencia	Referencia
<b>ATG3</b>	QPCR ATG3 5'	CGAGTTCAAGGTCGAGCAGT	Esta Tesis
	QPCR ATG3 3'	CCACCCACAGACATGGTGTA	
<b>ATG8</b>	QPCR ATG8 5'	TCCCCGATATCGACAAGAAG	Esta Tesis
	QPCR ATG8 3'	TGCGGATGACGTACACAAAT	
<b>CAL2</b>	QPCR CAL2 5'	ACCCTGACTACGTCCACGAC	Esta Tesis
	QPCR CAL2 3'	GTCCTCAGCGAACTTCTTGG	
<b>ERO1</b>	QPCR ERO1 5'	TGTCAACCTGCTCATCAACC	Esta Tesis
	QPCR ERO1 3'	CTGCTGCTGCTACTGCTGTC	
<b>PDI6</b>	QPCR PDI 5'	GGTGTGGCTGGTTGAGTTCT	Esta Tesis
	QPCR PDI 3'	CTCTTTGGCGTCCTCACAGT	
<b>Rb60</b>	QPCR PDI 1A 5'	CCAAGCGCTTTAAGAAGGTG	Esta Tesis
	QPCR PDI 1A 3'	GTAGGGAAGCCCTTGACCTC	
<b>GPXH</b>	QPCR GPXH 5'	GCGGTCGCCAATAACCAAT	(Fischer et al., 2009)
	QPCR GPXH 3'	AAGGGCTGTCCCGAAAGC	
<b>GSTS1</b>	QPCR GSTS1 5'	CAGAGGTGAAAGGCGGATAC	(Fischer et al., 2012)
	QPCR GSTS1 3'	GTGTTGCAATGGACTTCAGC	
<b>CBLP</b>	QPCR CBLP 5'	CTTCTCGCCCATGACCAC	(Pootakham et al., 2010)
	QPCR CBLP 3'	CCCACCAGGTTGTTCTTCAG	
<b>DAD1</b>	QPCR DAD1 5'	AGGTTCTGGATGCGTTCCTA	Esta Tesis
	QPCR DAD1 3'	ACACAGTCAGGGCGAAGAAG	
<b>FKBP12</b>	QPCR FKBP12 5'	CTGACCATCAGCCACGACT	Esta Tesis
	QPCR FKBP12 3'	ACATCGAACACCAGGGTAGC	
<b>CYC6</b>	QPCR CYC6 5'	GCTTCAAGGTGGAGAGCATC	Esta Tesis
	QPCR CYC6 3'	TAGTACTTCCAGGCGGCATC	
<b>STREPATG8</b>	QPCR STREP 5'	CGCAGTTCGAAAAGGGTGCA	Esta Tesis
	QPCR STREP 3'	ATGACTGGAATTCGGTCTGG	

**Tabla 2:** Oligonucleótidos empleados en esta Tesis.

### **3.2.2 Aislamiento de ácidos nucleicos.**

#### **3.2.2.1 Aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli*.**

Para el aislamiento de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala se utilizó el método de la lisis alcalina (Sambrook, 2012). Las células se rompieron con SDS (dodecilsulfato sódico) y NaOH, tras lo cual se eliminó el DNA cromosómico y las proteínas mediante precipitación con acetato potásico y centrifugación. Se precipitó el DNA plasmídico con etanol absoluto frío y acetato potásico. Después de centrifugar y dejar secar el pellet de DNA plasmídico, se resuspendió en agua destilada o tampón Tris-HCl 10 mM pH 8. Para eliminar el RNA se trató con RNAsa A de páncreas bovino (Sigma) durante 1h a 37°C.

Para obtener DNA plasmídico de alta calidad, bien para secuenciación o para transformación de *E. coli* o *C. reinhardtii*, se utilizaron distintos sistemas comerciales tales como “GFX Micro Plasmid Prep Kit” (GE Healthcare) o “Illustra plasmidPrep Midi Flow Kit” (GE Healthcare), según la cantidad de DNA a aislar.

#### **3.2.2.2 Aislamiento de RNA total de *C. reinhardtii*.**

Para el aislamiento de RNA total de células de *C. reinhardtii*, se centrifugaron a baja velocidad (4 min a 3000 g) 20 ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento ( $10^6$  cel/ml). Se lavaron las células con 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM pH 8 y se guardaron los pellets a -80°C. Posteriormente, se resuspendieron en 0.5 ml de tampón de lisis y se sometieron a repetidas extracciones con fenol:cloroformo:isoamil alcohol (25:24:1). Se precipitó el RNA con LiCl a una concentración final de 2 M, a 4°C durante aproximadamente 16 h. Después volvió a precipitarse el RNA con 3 volúmenes de etanol absoluto en presencia de 0.3 M de NaAc pH 5.2, a -20°C durante 30 minutos. El precipitado de RNA se resuspendió en un volumen adecuado de agua tratada con DEPC.

- ❖ Tampón de lisis: 600 mM de NaCl, 100 mM de Tris-HCl pH 8, 10 mM de EDTA pH 8 y SDS al 4 %.

### **3.2.3 Análisis de DNA.**

#### **3.2.3.1 Electroforesis de DNA en geles de agarosa.**

La separación de fragmentos de DNA, bien para su análisis o bien para su posterior aislamiento, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook, 2012). Los geles se prepararon en tampón TBE 0.5X con una concentración de agarosa del 0.7 al 1.5 %, según la longitud de los fragmentos de DNA. A las muestras a analizar se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga. Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos Mini Sub Cell GT (Bio-Rad) en tampón TBE 0.5X.

- ❖ Tampón TBE 1X: 90 mM de Tris-borato y 2 mM de EDTA pH 8.
- ❖ Tampón de carga: azul de bromofenol al 0.25% (p/v), xileno-cianol FF al 0.25 % (p/v) y glicol al 50 % en agua.

#### **3.2.3.2 Purificación de fragmentos de DNA.**

La purificación de fragmentos de DNA, procedentes de geles de agarosa o bien DNA en solución, se llevó a cabo mediante el sistema de purificación “GFX PCR and Gel Band Purification Kit” comercializado por GE Healthcare, siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **3.2.3.3 Manipulaciones enzimáticas del DNA.**

Las manipulaciones enzimáticas del DNA se llevaron a cabo según lo descrito en Sambrook 2012 y siguiendo las instrucciones de los distintos fabricantes.

Las digestiones se realizaron con endonucleasas de restricción comercializadas por distintos fabricantes (New England Biolabs, Roche o Takara). Para eliminar el RNA de las preparaciones de DNA plasmídico, se añadió RNasa A (Sigma) a las mezclas de las muestras con las correspondientes enzimas de restricción.

La desfosforilación de los extremos de vectores abiertos con enzimas de restricción se realizó mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (Roche). Las ligaciones de fragmentos de DNA se llevaron a cabo con ligasa de DNA del fago T4 (Promega).

#### **3.2.3.4 Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.**

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo de forma rutinaria con la polimerasa “Biotaq” de Bioline. Cuando fue necesario un alto grado de fidelidad, se utilizó la polimerasa “Herculase” de Stratagene. En todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador “T-personal” de Biometra, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

#### **3.2.3.5 Secuenciación de DNA.**

La secuenciación de DNA se llevó a cabo por encargo al servicio de secuenciación comercial de MWG Operon Biotech (Alemania).

#### **3.2.4 Análisis de RNA.**

##### **3.2.4.1 Electroforesis de RNA en geles de agarosa.**

La separación y visualización de fragmentos de RNA de *C. reinhardtii* se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Sambrook, 2012). Los geles se prepararon en tampón TBE 0.5X con una concentración de agarosa del 0.7 %. A las muestras a analizar se les añadió 1/10 de su volumen de tampón de carga para RNA. Las electroforesis se llevaron a cabo en aparatos Mini Sub Cell GT (Bio-Rad) en tampón TBE 0.5X.

- ❖ Tampón TBE 1X: 90 mM de Tris-borato y 2 mM de EDTA pH 8.
- ❖ Tampón de carga: azul de bromofenol al 0.25% (p/v), xileno-cianol FF al 0.25 % (p/v) y glicol al 50 % en agua tratada con DEPC.

##### **3.2.4.2 Retrotranscripción.**

La síntesis de cDNA a partir de RNA de *C. reinhardtii*, para su posterior análisis mediante PCR cuantitativa, se realizó mediante el sistema comercial “SuperScript First-Strand Synthesis System” de Invitrogen, siguiendo las instrucciones del fabricante para casos de alto contenido en GC: se emplearon 2 µg de RNA total, oligo dT y 100 unidades de “SuperScript II RNase H reverse transcriptase” en un volumen total de 50 µl.

### 3.2.4.3 Cuantificación de cDNA mediante PCR cuantitativa.

La PCR cuantitativa en tiempo real o qPCR se llevó a cabo para cuantificar la expresión génica a partir de cDNA de *C. reinhardtii* empleando en el sistema “StepOne Real-Time PCR” de Applied Biosystems o bien en el sistema “iCYCLER” de Bio-Rad. Las reacciones de PCR contenían 10 µl de “FastStart Universal SYBR Green Master” (04913850001, Roche), 1 µl de la reacción de retrotranscripción (cDNA), 250 nM de cada oligonucleótido y agua destilada hasta un volumen final de 20 µl. Cuando fue necesario, dependiendo del gen, se añadió 1 M de Betaína (Sigma) a la reacción. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: preincubación a 95°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C 15 s e hibridación+elongación a 55-60°C (dependiendo del gen) durante 60 s. Como gen control de expresión constitutiva se utilizó el gen *CBLP* (Pootakham et al., 2010). Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

A continuación se detalla la temperatura de reacción utilizada para cada gen, así como la longitud del fragmento amplificado y si fue necesario el uso de Betaína:

Gen	Tª reacción (°C)	Fragmento (pb)	Betaína
<b><i>ATG3</i></b>	58	96	-
<b><i>ATG8</i></b>	58	75	-
<b><i>CAL2</i></b>	58	149	-
<b><i>ERO1</i></b>	55	150	1 M
<b><i>PDI6</i></b>	55	133	1 M
<b><i>Rb60</i></b>	58	94	-
<b><i>GPXH</i></b>	58	104	-
<b><i>GSTS1</i></b>	58	199	-
<b><i>CBLP</i></b>	55-60	100	Indiferente
<b><i>DAD1</i></b>	60	141	-
<b><i>FKBP12</i></b>	58	112	-
<b><i>CYC6</i></b>	60	145	-
<b><i>STREPATG8</i></b>	60	124	-

**Tabla 3:** Condiciones de qPCR utilizadas para cada uno de los genes analizados.



#### 3.2.4.4 Análisis transcriptómico.

La secuenciación masiva de RNA de *Chlamydomonas* se llevó a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Sabeeha S. Merchant (University of California LA, EEUU) con objeto de identificar transcritos regulados por  $\text{Ni}^{2+}$  independientemente de CRR1. Para ello, se emplearon preparaciones de RNA total de la estirpe mutante *crr1-2* y de la estirpe complementada en presencia o ausencia de  $50 \mu\text{M}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  durante 6 horas. Las muestras se secuenciaron en un sistema Illumina y se determinó la abundancia de los transcritos en términos de RPKM (Urzica et al., 2012). El análisis de expresión diferencial se realizó con el software DESeq (Anders and Huber, 2010), corrigiendo los valores P obtenidos con el método Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995). Los patrones de expresión de los distintos genes se agruparon con el programa MVCluster.Seq.

Se tuvieron en cuenta todos los transcritos cuya abundancia se consideró significativamente diferente por Cuffdiff ( $q < 0.05$ ) entre ausencia y presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  y cuya abundancia fuese mayor o igual a 10 RPKM. De este conjunto, se generó la lista final de transcritos inducidos por  $\text{Ni}^{2+}$  independientemente de CRR1, identificando aquellos que no se expresaban de forma significativamente diferente por Cuffdiff ( $q > 0.05$ ) entre la estirpe mutante y complementada en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ . Para comparar los datos obtenidos con la respuesta transcripcional a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se realinearon los transcritos obtenidos en (Urzica et al., 2012) usando la última versión del genoma de *C. reinhardtii* (v5) y se generó la lista de transcritos expresados de forma significativamente diferente entre 0 y 1 hora después de añadir 1 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Para comparar la abundancia de transcritos en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  con estudios publicados anteriormente (tratamiento con rosa bengala, deficiencia de ClpP1, tratamiento con rapamicina, anoxia en oscuridad, tratamiento con Fe, presencia o ausencia de Cu y presencia o ausencia de Zn) se aplicó un límite mayor o igual a 10 FPKMS/RPKMS y una diferencia de expresión mayor o igual a 2. La lista de transcritos sobre-expresados que cumplían estos requisitos se comparó con la lista de transcritos sobre-expresados en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  que cumplían los mismos requisitos. El valor p se calculó usando R, con el comando `sum(dhyper((q:m, k, 17301-k, m)))`, donde q=número de transcritos solapantes, m=número de transcritos cuya abundancia aumenta en el tratamiento con el que se compara, y k=número de transcritos cuya abundancia aumenta en el tratamiento con  $\text{Ni}^{2+}$ . Se compararon todos los transcritos usando la versión 4 del genoma de *C. reinhardtii*.

### **3.2.5 Introducción de DNA exógeno en organismos.**

#### **3.2.5.1 Transformación de células de *E. coli*.**

Para transformar las células competentes de *E. coli DH5 $\alpha$*  (HANAHAH, 1983) se empleó el método del choque térmico. Una alícuota de células se mezcló con el DNA plasmídico y se mantuvo en hielo durante 30 min. Se llevó la mezcla a 42°C durante 1 min y 30 seg, y de nuevo se volvió a incubar en hielo durante 2 min. Se añadió 1 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 1 h. Finalmente, se sembraron las células en medio LB sólido suplementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina y se incubó a 37°C durante 16 h.

#### **3.2.5.2 Transformación de células de *C. reinhardtii*.**

Para transformar las células de *C. reinhardtii* se empleó el método de la electroporación. Para ello, se utilizaron células en fase exponencial de crecimiento ( $10^6$  cél/ml) y se recogieron mediante centrifugación a baja velocidad (4 min a 3000  $g$ ). Se resuspendió en medio TAP+60 mM de sacarosa concentrando las células 100 veces. Para cada electroporación, se introdujeron 250  $\mu\text{l}$  de concentrado de células en una cubeta de electroporación con 0.4 cm de separación entre los electrodos, y se añadió 1  $\mu\text{g}$  del DNA transformante en un volumen de aproximadamente 10  $\mu\text{l}$ . La cubeta con la mezcla de células y DNA transformante se mantuvo en hielo de 10 a 30 min, tras lo cual se realizó el pulso de electroporación con las siguientes condiciones: 800 V (2000 V/cm) y 15  $\mu\text{F}$  sin resistencia, usando un electroporador Equibio Easyjet Optima. Inmediatamente se transfirieron las células a un tubo Falcon con 10 ml de medio TAP+60 mM de sacarosa y se incubó durante 16 h a 25°C, en luz continua ( $50\text{-}70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y a 30 rpm de agitación en un agitador "Inteli-Mixer RM-2L" de Sky Line. Se recogieron las células mediante centrifugación a baja velocidad y se resuspendieron en 700  $\mu\text{l}$  de medio TAP. Este volumen se sembró en placas de TAP sólido con 10  $\mu\text{g/ml}$  de Paramomicina (Sigma), se incubaron a 25°C y en luz continua ( $50\text{-}70 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) hasta que empezaron a aparecer las colonias transformantes (5-7 días).

### **3.3 Métodos bioquímicos.**

#### **3.3.1 Preparación de extractos celulares de *C. reinhardtii*.**

Para obtener extractos celulares de *C. reinhardtii* se recogió un volumen adecuado de cultivo en fase exponencial de crecimiento ( $10^6$  cel/ml) mediante centrifugación a baja velocidad (4 min a 3000 g). Se lavaron las células con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7.5 y se resuspendieron en un volumen adecuado del mismo tampón. La suspensión celular obtenida se sometió a dos ciclos consecutivos de congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante al menos 2 h y descongelación lenta a temperatura ambiente. Se separó el extracto soluble de la fracción insoluble mediante centrifugación a 15700 g durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.3.2 Cuantificación de proteínas.**

La cuantificación de proteínas de los extractos de *C. reinhardtii* se realizó mediante el método de Bradford (BRADFORD, 1976), con el reactivo "Protein Assay Dye Reagent Concentrate" de Bio-Rad, siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

#### **3.3.3 Electroforesis unidimensional de proteínas en geles de poliacrilamida.**

La separación analítica de proteínas mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizó en geles de poliacrilamida tal y como se encuentra descrito (Sambrook, 2012). Se usaron aparatos "Miniprotean" de Bio-Rad. La concentración de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida 29:1) en los geles de separación fue del 15 % (v/v) para el análisis de la proteína ATG8 y del 12 % (v/v) para el análisis de la proteína FKBP12. Se añadió a las muestras a analizar 1/10 de su volumen de tampón de carga para proteínas y se desnaturalizó mediante calentamiento a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 5 min. Como marcador de peso molecular se utilizó el patrón comercial "SeeBlue" de Invitrogen.

- ❖ **Gel de empaquetamiento:** 117 mM de Tris-HCl pH 6.8, 3.7 % (v/v) de poliacrilamida, SDS al 0.1 % (p/v), APS al 0.14 % (p/v) y Temed al 0.2 % (v/v) en agua destilada purificada.
- ❖ **Gel de separación:** 374 mM de Tris-HCl pH 8.8, poliacrilamida al 12 o 15 % (v/v), SDS al 0.1 % (p/v), APS al 0.07 % (p/v) y Temed al 0.1 % (v/v) en agua destilada purificada.
- ❖ **Tampón de electroforesis:** 25 mM de Tris-Base, 192 mM de glicina y SDS al 0.1 % (p/v).

- ❖ **Tampón de carga para proteínas:** 125 mM de Tris-HCl pH 6.8, glicerol al 20 % (v/v), SDS al 4 % (p/v), 2-mercaptoetanol al 10 % (v/v) y azul de bromofenol al 0,005 % (p/v).

### 3.3.4 Técnicas inmunológicas.

#### 3.3.4.1 Inmunodetección de proteínas mediante Western-blot.

La detección específica de proteínas se realizó mediante Western-blot, usando la proteína FKBP12 como control de carga (Crespo et al., 2005). En primer lugar, se sometieron las muestras de proteínas a analizar a electroforesis unidimensional según se describe en el apartado 3.3.3, cargando 30 µg de proteína de cada muestra por carril. A continuación, las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (162-0115 de Bio-Rad o HATF00010 de Millipore). La transferencia se llevó a cabo con el sistema semi-húmedo “TE 77 PWR” de Amersham, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez realizada la transferencia, las membranas se incubaron a temperatura ambiente en solución de bloqueo durante 1 h. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario ( $\alpha$ ATG8 1:2500 o  $\alpha$ FKBP12 1:3000) diluido en solución de bloqueo durante 16 h a 4°C. A continuación se lavaron las membranas 4 veces durante 8 min con solución de lavado, y se incubaron con anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado a peroxidasa (A6154, Sigma-Aldrich) diluido 1:10000 en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados, finalmente se llevó a cabo la detección de las proteínas con sistemas comerciales (RPN2132 de GE Healthcare o WBLUR0500 de Millipore), siguiendo las instrucciones del fabricante.

- ❖ **Solución de bloqueo:** leche en polvo desnatada (La Asturiana) al 5 % (p/v) y Tween 20 (A4974, Applichem) al 0.1 % (v/v) en tampón PBS.
- ❖ **Solución de lavado:** Tween 20 (A4974, Applichem) al 0.1 % (v/v) en tampón PBS.
- ❖ **Tampón PBS:** 136 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 9 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### 3.3.4.2 Inmunolocalización de proteínas mediante microscopía de fluorescencia y cuantificación de la señal.

La localización celular de la proteína ATG8 se investigó mediante técnicas de microscopía de fluorescencia. Para ello, se inmovilizaron las células de *Chlamydomonas* a un portaobjetos tratado con poli-L-lisina durante 15-20 min. A continuación, las células se permeabilizaron y fijaron metabolitamente sumergiendo el portaobjetos en metanol frío (-20°C) durante 6 min. Una vez seco, se incubó con solución de bloqueo durante 1 h y seguidamente con el anticuerpo primario ( $\alpha$ ATG8 policlonal purificado) diluido 500 veces en solución de bloqueo durante 3 h. Se lavaron las muestras 4 veces con solución de bloqueo y se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado a isotiocianato de fluoresceína, F4890 de Sigma-Aldrich) diluido 500 veces en solución de bloqueo durante 1 h. Posteriormente, se lavaron las muestras 4 veces con solución de lavado y se dejaron secar las células. Se aplicó una pequeña cantidad (3-5  $\mu$ l) de "Fluor Safe Reagent" (Calbiochem) en cada pocillo y se selló con un cubreobjetos y laca de uñas como adhesivo.

Las muestras se observaron en un microscopio DM6000B (Leica) con cámara ORCA-ER (Hamamatsu) y se procesaron con el software LasAF (Leica Application Suite Advanced Fluorescence) de Leica. Para el análisis comparativo entre distintas muestras se utilizó el mismo tiempo de adquisición. La inmunofluorescencia de células individuales se cuantificó usando el software ImageJ.

- ❖ **Solución de bloqueo:** BSA al 1 % (p/v) en tampón PBS.
- ❖ **Solución de lavado:** Tampón PBS: 136 mM de NaCl, 2.7 mM de KCl, 10 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 9 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

### 3.3.5 Cuantificación de glutatión oxidado y reducido.

Para cuantificar la cantidad de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) de cada muestra a analizar, se recogieron las células mediante centrifugación a baja velocidad (4 min a 3000 g). Se lavaron las células con tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.5 y se resuspendieron en 0.2 N de HCl. Se rompieron las células mediante dos ciclos consecutivos de congelación a -80°C durante al menos 2 h y descongelación lenta a temperatura ambiente. Se obtuvieron los extractos crudos por centrifugación en frío (4°C) a 15000 g durante 20 min. Se neutralizaron 500  $\mu$ l de la muestra añadiendo 50  $\mu$ l de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7.5 y 0.2 N de NaOH hasta llegar a un pH de entre 5 y 6. La muestra neutralizada se utilizó para medir la cantidad total de glutatión (GSH+GSSG) por el método de Tietze (Tietze, 1969) adaptado por Queval y Noctor (Queval and Noctor, 2007), que se basa en la reducción por GSH de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis(2-nitro-benzoico), D8130 de Sigma-Aldrich). El glutatión oxidado se midió después de

tratar la muestra neutralizada con 4-vinilpiridina 10 mM (V320-4, Sigma-Aldrich) durante 30 min a 25°C. Para eliminar el exceso de 4-vinilpiridina, la muestra derivatizada se centrifugó 2 veces en frío (4°C) a 15000 *g* durante 20 min.

Para cuantificar el glutatión total o el glutatión oxidado, se añadió a la muestra a medir una mezcla que contenía 120 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.5, 300 µM de DTNB, 500 µM de NADPH, 1 mM de EDTA pH 8 y 1 u/ml de glutatión reductasa (G3664, Sigma-Aldrich). La reducción de DTNB se midió a 412 nm. Se usaron distintas concentraciones de GSH (G4251, Sigma-Aldrich) desde 0 a 5 µM como referencias.

### **3.4 Ensayos celulares.**

#### **3.4.1 Determinación de la concentración celular en cámara de Neubauer.**

La determinación de la concentración celular en cultivos de *C. reinhardtii* para definir la fase de crecimiento se realizó mediante conteo en cámara de Neubauer. Se diluyó el cultivo hasta que el número de células a contar en cada campo fuese entre 30 y 300. Para fijar las células e impedir su movimiento, se utilizó yodina a una concentración final del 0.03%. Las células fueron visualizadas con un microscopio óptico (Leica) utilizando el campo claro. Se contaron las células de todos los campos de la cámara de Neubauer, y para determinar la concentración celular se aplicó la siguiente fórmula:

$$(n^{\circ} \text{ total de células}/16) \cdot FD \cdot 5 \cdot 1000 = \text{células/ml}$$

nº total de células: suma de las células de todos los campos

FD: factor de dilución aplicado al cultivo

#### **3.4.2 Determinación de la viabilidad celular.**

Para determinar la viabilidad celular se utilizó el colorante Evans Blue (E2129, Sigma-Aldrich), que sólo tiñe las células no viables mientras que las células viables excluyen el colorante. Se incubaron 450 µl de cultivo con una concentración de Evans Blue del 0.1 % (p/v) durante 5 min. Se lavaron las células con medio TAP para eliminar el exceso de colorante y se resuspendió en el mismo volumen que el cultivo inicial con medio TAP. Se visualizaron las células en un microscopio de contraste de fases y se cuantificó la cantidad de células vivas y muertas del cultivo.

## 4 COPIA DE LAS PUBLICACIONES

### 4.1 Oxidative Stress Contributes to Autophagy Induction in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*.

#### REFERENCIA COMPLETA:

Pérez-Martín M, Pérez-Pérez ME, Lemaire SD, Crespo JL. Oxidative stress contributes to autophagy induction in response to endoplasmic reticulum stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* (2014), 166 (2): 997-1008.

# Oxidative Stress Contributes to Autophagy Induction in Response to Endoplasmic Reticulum Stress in *Chlamydomonas reinhardtii*<sup>1[W]</sup>

Marta Pérez-Martín, María Esther Pérez-Pérez, Stéphane D. Lemaire, and José L. Crespo\*

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Sevilla, 41092 Sevilla, Spain (M.P.-M., J.L.C.); and Centre National de la Recherche Scientifique (M.E.P.-P.; S.D.L.) and Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie, University of Paris 06 (M.E.P.-P.; S.D.L.), Unité Mixte de Recherche 8226, Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, Institut de Biologie Physico-Chimique, 75005 Paris, France

The accumulation of unfolded /misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) results in the activation of stress responses, such as the unfolded protein response or the catabolic process of autophagy to ultimately recover cellular homeostasis. ER stress also promotes the production of reactive oxygen species, which play an important role in autophagy regulation. However, it remains unknown whether reactive oxygen species are involved in ER stress-induced autophagy. In this study, we provide evidence connecting redox imbalance caused by ER stress and autophagy activation in the model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Treatment of *C. reinhardtii* cells with the ER stressors tunicamycin or dithiothreitol resulted in up-regulation of the expression of genes encoding ER resident endoplasmic reticulum oxidoreductin1 oxidoreductase and protein disulfide isomerases. ER stress also triggered autophagy in *C. reinhardtii* based on the protein abundance, lipidation, cellular distribution, and mRNA levels of the autophagy marker ATG8. Moreover, increases in the oxidation of the glutathione pool and the expression of oxidative stress-related genes were detected in tunicamycin-treated cells. Our results revealed that the antioxidant glutathione partially suppressed ER stress-induced autophagy and decreased the toxicity of tunicamycin, suggesting that oxidative stress participates in the control of autophagy in response to ER stress in *C. reinhardtii*. In close agreement, we also found that autophagy activation by tunicamycin was more pronounced in the *C. reinhardtii* *sor1* mutant, which shows increased expression of oxidative stress-related genes.

All living organisms have evolved sophisticated mechanisms to efficiently respond and adapt their growth and metabolism to different types of stress. A well-documented example of such stress-induced responses is the process of autophagy or self-degradation, which is structurally and functionally conserved in all eukaryotes. During autophagy (also known as macroautophagy), cytoplasmic components, including proteins, membranes, and even organelles, are nonselectively enclosed within a double-membrane vesicle known as autophagosome and delivered to the vacuole/lysosome for degradation of toxic or damaged components and recycling of needed nutrients (Xie and Klionsky, 2007; Nakatogawa et al., 2009; Li and Vierstra, 2012; Liu and Bassham, 2012).

Autophagy is mediated by a set of proteins coded by ATG (autophagy-related) genes that are widely conserved from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) to humans. Homologs of ATG genes have been reported in plant and algal genomes, indicating that autophagy is also conserved in photosynthetic organisms (Thompson and Vierstra, 2005; Bassham et al., 2006; Diaz-Troya et al., 2008b; Avin-Wittenberg et al., 2012). Some ATG proteins play a structural role in autophagy and are essential for the formation of the autophagosome. For instance, the ATG8 protein anchors to the autophagosome membrane through its covalent binding to phosphatidylethanolamine, and the ATG8-phosphatidylethanolamine conjugate is essential for the formation and completion of the autophagosome (Ichimura et al., 2000). ATG genes are conserved in *Chlamydomonas reinhardtii* (algae; Diaz-Troya et al., 2008b; Pérez-Pérez et al., 2010), and autophagy has been investigated in this model system by monitoring the abundance, lipidation state, and cellular distribution of the ATG8 protein under several growth and stress conditions. As reported for other systems, nitrogen or carbon depletion triggers autophagy in *C. reinhardtii* (Pérez-Pérez et al., 2010). Moreover, entry of *C. reinhardtii* cells into stationary growth phase activates autophagy in a reversible manner, because the process is quickly down-regulated when cells return to exponential growth (Pérez-Pérez et al., 2010). Autophagy is also induced in *C. reinhardtii* cells treated with hydrogen peroxide or

<sup>1</sup> This work was supported, in part, by the Intra European Fellowship (European Union Marie Curie Fellowship no. PIEF-GA-2011-298652-REDOXDYNAMICS to M.E.P.-P.), by LABEX DYNAMO (grant no. ANR-11-LABX-0011 to M.E.P.-P. and S.D.L.), by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant nos. BFU-2009-07368 to J.L.C. and BFU-2012-35913 to J.L.C.), and by Junta de Andalucía (grant no. CVI-7336 to J.L.C.).

\* Address correspondence to crespo@ibvf.csic.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantphysiol.org) is: José L. Crespo (crespo@ibvf.csic.es).

<sup>[W]</sup> The online version of this article contains Web-only data.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.114.243659



methyl viologen (MV), indicating that oxidative stress triggers this process in algae (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012a). Reactive oxygen species (ROS) are potent inducers of autophagy in *C. reinhardtii* and plants (Liu and Bassham, 2012; Pérez-Pérez et al., 2012b). Indeed, a link between photo-oxidative damage, ROS accumulation, and autophagy activation has been shown in *C. reinhardtii* cells with a decreased carotenoid content caused by either the mutation of phytoene synthase or the inhibition of phytoene desaturase by the herbicide norflurazon (Pérez-Pérez et al., 2012a). Moreover, ROS generated in the chloroplast of carotenoid-deficient cells or the chloroplast of wild-type cells subjected to high light stress activate autophagy (Pérez-Pérez et al., 2012a).

The accumulation of unfolded/misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) is known to trigger autophagy in yeast (Bernales et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006) and mammals (Ogata et al., 2006). More recently, induction of autophagy by ER stress has also been reported in land plants and algae (Pérez-Pérez et al., 2010; Liu et al., 2012), indicating that the signaling pathways controlling autophagy activation in response to this intracellular stress might be conserved in photosynthetic organisms. In *C. reinhardtii*, tunicamycin, which induces ER stress by inhibition of N-linked glycosylation, strongly increases the abundance and lipidation of ATG8 and modifies its cellular distribution (Pérez-Pérez et al., 2010). The accumulation of misfolded proteins in the ER is a potent stress signal that induces the expression of chaperones and other proteins required for the reestablishment of cell homeostasis, a signaling process known as the unfolded protein response (UPR; Walter and Ron, 2011). ER stress is perceived in the cell by key signaling proteins, such as the highly conserved inositol-requiring enzyme1 kinase, which transduces stress signals to the nucleus by promoting the splicing of basic leucine zipper (bZIP)-like transcription factors (Walter and Ron, 2011). Eukaryotic cells use a quality control mechanism that recognizes aberrantly folded proteins in the ER for their degradation through the proteasome, a process that is known as ER-associated degradation (Walter and Ron, 2011). Prolonged ER stress also triggers autophagy to remove unfolded proteins and counterbalance ER expansion caused by UPR (Bernales et al., 2006).

Unlike other cellular compartments, the ER provides, through ER-resident oxidoreductases, an oxidative environment that facilitates the oxidation of cysteines and thereby, the formation of disulfide bonds (Tu and Weissman, 2004). In yeasts and mammals, it has been shown that endoplasmic reticulum oxidoreductin1 (ERO1) is a major source of ROS in the ER and the cell (Haynes et al., 2004; Tu and Weissman, 2004). Oxidative protein folding in the ER occurs, in part, through the formation of disulfide bonds by protein disulfide isomerases (PDIs). To introduce disulfides into client proteins, PDIs must be maintained in an oxidized state, and ERO1 is mainly responsible for keeping PDI oxidized and active in the ER (Fränd and Kaiser,

1999). ERO1 uses molecular oxygen as the final electron acceptor and hence, forms one molecule of hydrogen peroxide for every disulfide that it introduces (Tu and Weissman, 2004). Several studies have established an association between ER stress and ROS generation (Malhotra and Kaufman, 2007; Rutkowski and Kaufman, 2007; Ozgur et al., 2014), and the molecular mechanisms by which ROS are produced during UPR have been thoroughly reviewed (Santos et al., 2009).

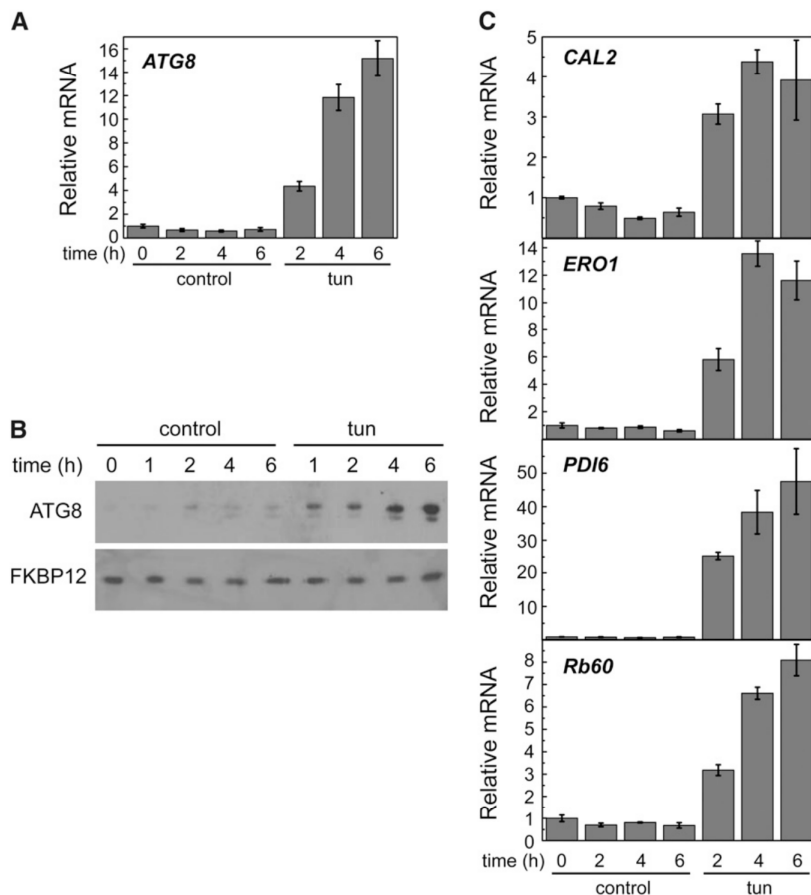
ROS have been proposed to play an important role in the mechanisms of autophagy induction in response to various stress conditions in mammals, plants, and algae (Huang et al., 2011; Scherz-Shouval and Elazar, 2011; Szumiel, 2011; Li et al., 2012; Pérez-Pérez et al., 2012b). Although ER stress promotes ROS production and induces autophagy, it remains unknown whether ROS are involved in ER stress-induced autophagy. In this study, we provide evidence connecting autophagy activation in ER-stressed cells with redox imbalance generated from the UPR-regulated oxidative folding machinery in *C. reinhardtii* and propose that oxidative stress contributes to the induction of autophagy by ER stress.

## RESULTS

### Tunicamycin Triggers ER Stress and Autophagy in *C. reinhardtii*

In a previous study, we showed that tunicamycin triggers autophagy in *C. reinhardtii* (Pérez-Pérez et al., 2010). To further characterize the effect of tunicamycin on autophagy, we analyzed the expression of the *ATG8* gene by quantitative real-time PCR (qPCR). Tunicamycin treatment resulted in a progressive increase of *ATG8* transcript levels (Fig. 1A). In close agreement, an increase in *ATG8* protein abundance and the appearance of modified *ATG8* forms were observed in ER-stressed cells (Fig. 1B). No effect was observed on the amount of FK506 Binding Protein12 (FKBP12), an ER stress unrelated protein (Crespo et al., 2005). Transcription of *ATG3*, encoding an E2-like enzyme involved in *ATG8* lipidation (Ichimura et al., 2000), was also analyzed in tunicamycin-treated cells to investigate the participation of other *ATG* genes in ER stress. qPCR analysis revealed that, similar to *ATG8*, *ATG3* expression was up-regulated with tunicamycin as well as other stressors previously shown to induce autophagy, such as hydrogen peroxide, MV, or norflurazon (Pérez-Pérez et al., 2010, 2012a; Supplemental Fig. S1). As expected, tunicamycin had no effect on the expression of *FKBP12* (Supplemental Fig. S2).

The cellular response to ER stress in *C. reinhardtii* is still poorly characterized, and no markers have been established to investigate this process in this model alga. In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), it has been reported that expression of some UPR genes, such as the ER-resident chaperone Calreticulin2 (CAL2; At1g09210), increases in response to tunicamycin (Martínez and Chrispeels, 2003). We identified a member of the calreticulin



**Figure 1.** Tunicamycin triggers autophagy and ER stress in *C. reinhardtii* Log-phase cells grown in TAP medium were treated with  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  tunicamycin, and samples were taken at the indicated times and processed for expression analysis of *ATG8* (A) and *CAL2*, *ERO1*, *PDI6*, and *Rb60* (C) by qPCR (A and C) or western blot (B). Thirty micrograms of total extracts were resolved by 15% SDS-PAGE followed by western blotting with anti-ATG8 and anti-FKBP12 antibodies. Values are means of three independent experiments. tun, Tunicamycin.

family in the *C. reinhardtii* nuclear genome (Supplemental Fig. S3), which we denoted as *CAL2*. To investigate whether the expression of *CAL2* is subject to UPR regulation in *C. reinhardtii*, transcription of this gene was determined by qPCR analysis in cells treated with tunicamycin or other stressors that should not trigger ER stress. *CAL2* mRNA levels were increased with tunicamycin (Fig. 1C) but not hydrogen peroxide, MV, or norflurazon (Supplemental Fig. S1A), showing that this gene can be used to monitor ER stress in *C. reinhardtii*.

*ERO1* has not been previously described in algae, but based on its high evolutionary conservation, we identified an *ERO1* homolog in the *C. reinhardtii* genome (Supplemental Fig. S3). To investigate the participation of *C. reinhardtii* *ERO1* in ER stress, *ERO1* expression was analyzed by qPCR in cells treated with tunicamycin. We found a strong induction of *ERO1* expression in ER-stressed cells (Fig. 1C). In yeast, *ERO1* and *PDI* expressions are coordinately regulated and subjected to UPR regulation (Frand and Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998). *Rb60/PDI1A* is the only canonical *PDI* that has been studied in *C. reinhardtii*, although other *PDI*-like proteins seem to be conserved in the *C. reinhardtii* genome (Lemaire and Miginiac-Maslow, 2004; Filonova et al., 2013). *Rb60* seems to

have a dual localization in the ER and the chloroplast (Levitan et al., 2005), but its role in ER stress has not been investigated. We analyzed the expression of *Rb60* in response to tunicamycin treatment and found that, similar to *ERO1*, this gene was strongly up-regulated (Fig. 1C). Searching for *PDI* proteins other than *Rb60* in *C. reinhardtii*, we identified a *PDI*-like protein that we denoted *PDI6* containing an N-terminal J domain (Supplemental Fig. S3). This domain structure is conserved in ER proteins involved in the recognition and binding of misfolded proteins that fail to achieve their correct conformation in the ER (Schroda, 2004). We investigated the participation of *PDI6* in ER stress by analyzing the expression of this gene in tunicamycin-treated cells. *PDI6* mRNA level dramatically increased in ER-stressed cells (Fig. 1C), strongly suggesting that this gene is involved in the cellular response to this stress. Taken together, these results indicated that *CAL2*, *ERO1*, *Rb60*, and *PDI6* expression can be used to monitor ER stress in *C. reinhardtii*.

In addition to tunicamycin, we tested the effect of thapsigargin, an inhibitor of the ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase that triggers ER stress by depletion of luminal calcium stores (Urano et al., 2000), on autophagy and ER stress markers. Like tunicamycin treatment, thapsigargin led

to ER stress and autophagy activation in *C. reinhardtii* (Supplemental Fig. S4).

### Tunicamycin Triggers Oxidative Stress

We explored the possible induction of oxidative stress caused by ER stress through different approaches. We analyzed the expression of *Glutathione Peroxidase Homologous (GPXH)* and *Glutathione-S-transferase1 (GSTS1)* genes in ER-stressed cells. Both genes can be induced by several ROS, although *GPXH* is more significantly induced by singlet oxygen (Ledford et al., 2007; Fischer et al., 2007, 2012). Our results revealed a high induction of *GSTS1* and a moderate increase of *GPXH* expression in response to tunicamycin treatment (Fig. 2B), suggesting that ER stress may result in the activation of oxidative stress signaling in *C. reinhardtii*. However, the intracellular pool of total glutathione, comprising reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), was determined in cells treated with tunicamycin. Our results indicated that ER stress raised the intracellular concentration of GSSG (Fig. 2B) and decreased the GSH-to-GSSG ratio (Fig. 2C), a hallmark of redox imbalance (Foyer and Noctor, 2011). Taken together, these results indicated that ER stress triggers oxidative stress in *C. reinhardtii*.

### Dithiothreitol Causes ER Stress and Autophagy Activation

Disruption of disulfide bonds by dithiothreitol (DTT) results in accumulation of unfolded proteins in the ER and consequently, triggers ER stress. Massive aggregation of misfolded proteins caused by DTT has been shown to induce autophagy in various systems, including yeasts, mammals, and more recently, plants (Bernalles et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006; Liu et al., 2012). We investigated the effect of DTT on ER stress and autophagy in *C. reinhardtii* by different approaches. Autophagy was investigated in DTT-treated cells by examining *ATG8* expression. Our results showed that DTT induces *ATG8* expression (Fig. 3A), suggesting that

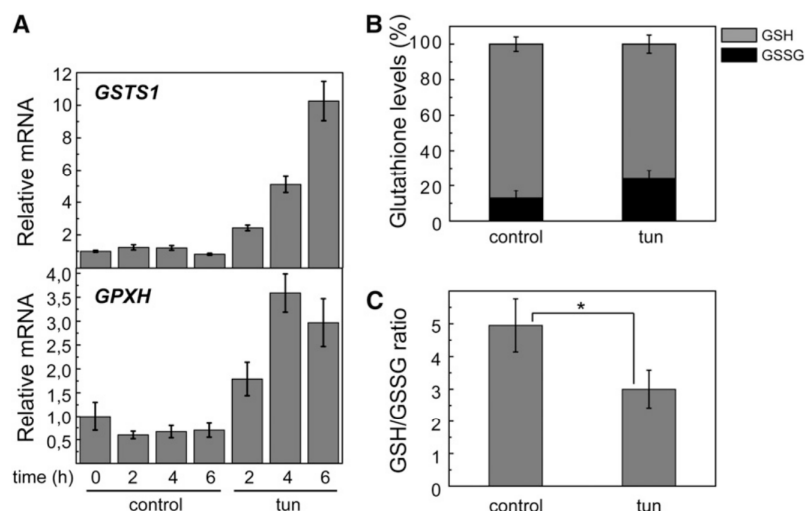
DTT efficiently triggers autophagy in *C. reinhardtii*. Activation of autophagy by DTT was confirmed by western-blot and immunofluorescence analyses of *ATG8*. The abundance of this protein progressively increased in response to DTT, which was shown by western blot (Fig. 3B). In agreement with this result, the cellular distribution of *ATG8* drastically changed on DTT treatment, which was observed by immunofluorescence microscopy. In untreated cells, the *ATG8* signal was very weak and localized in a single spot in some cells, whereas this signal was much stronger and detected as multiple spots in response to DTT or tunicamycin treatment (Fig. 3C).

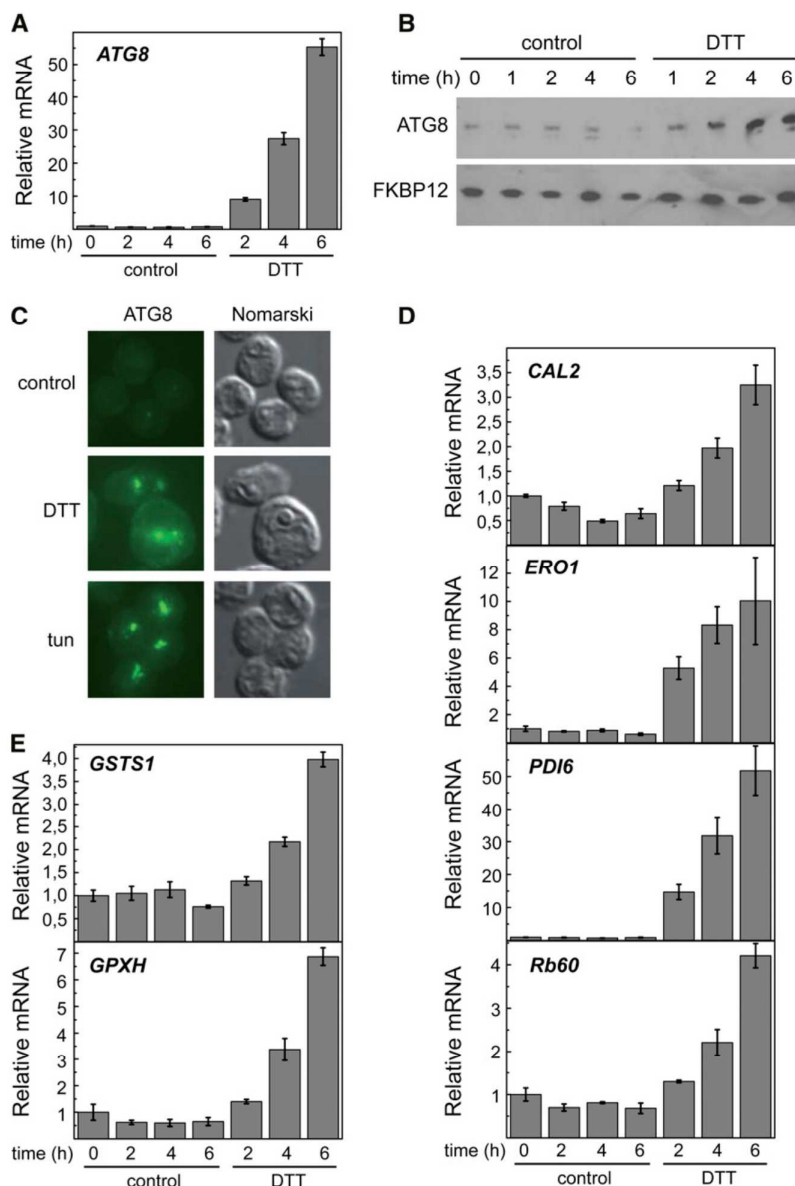
ER stress was monitored in DTT-treated cells by qPCR analysis of *CAL2*, *ERO1*, *PDI6*, and *Rb60* genes. DTT treatment resulted in the up-regulation of these four genes (Fig. 3D). This result confirmed that *CAL2*, *ERO1*, *PDI6*, and *Rb60* genes might be used as ER stress markers in *C. reinhardtii*. Given the tight correlation found between ER and oxidative stresses in tunicamycin-treated cells (Fig. 2), we also analyzed the expression of the oxidative stress-related genes *GSTS1* and *GPXH*. Interestingly, reductive stress induced by DTT may indirectly lead to oxidative stress in the cell, because transcription of both *GSTS1* and *GPXH* genes was enhanced (Fig. 3E).

### Glutathione Partially Suppresses ER Stress-Induced Autophagy

To test whether redox imbalance contributes to autophagy activation during ER stress, autophagy and ER stress markers were analyzed in cells treated with DTT, which massively reduces disulfide bonds. DTT was used alone or combined with GSH, an abundant antioxidant in the cell that plays an important role in ROS scavenging and maintenance of cellular redox homeostasis (Foyer and Noctor, 2011). Our results show that *ATG8* induction caused by DTT is decreased by 50% in the presence of GSH (Fig. 4A), indicating

**Figure 2.** Tunicamycin triggers oxidative stress. A, Expression analysis of *GSTS1* and *GPXH* genes by qPCR in cells treated with 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin at the indicated times. B, Intracellular pools of GSH and GSSG were determined in *C. reinhardtii* cells treated with 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin or drug vehicle (control); a 100% glutathione pool corresponds to  $837 \pm 58$  and  $744 \pm 64$  pmol per 1 million cells for control and tunicamycin-treated cells, respectively. C, GSH-to-GSSG ratio in tunicamycin-treated cells compared with untreated cells. Values are means of three independent experiments. tun, Tunicamycin. \*, Differences were significant at  $P < 0.05$  according to Student's *t* test.



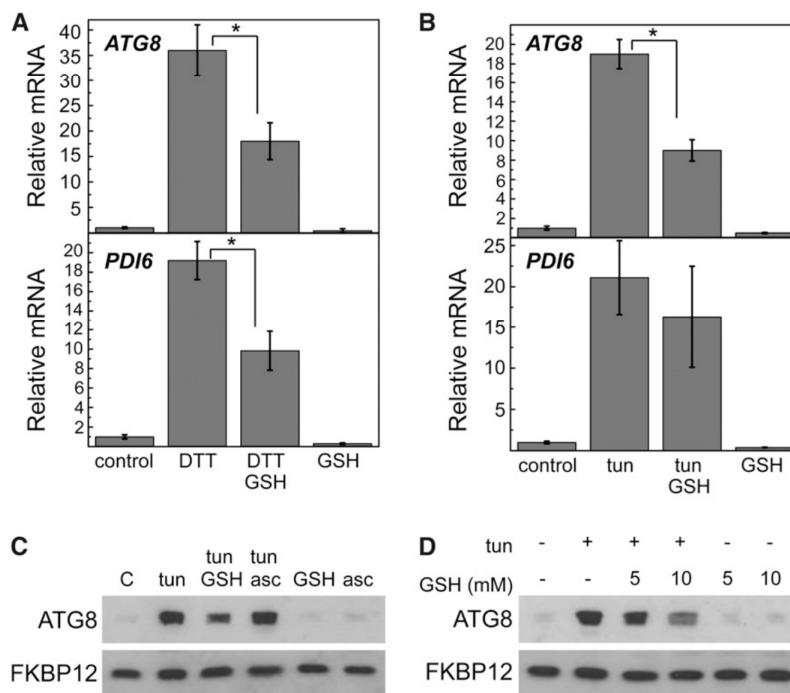


**Figure 3.** DTT triggers autophagy and ER stress in *C. reinhardtii*. Log-phase cells grown in TAP medium were treated with 2.5 mM DTT, and samples were taken at the indicated times for qPCR (A), western-blot (B), or immunofluorescence (C) analyses of ATG8. Immunofluorescence images correspond to 6 h of treatment. In addition to *ATG8*, expressions of the UPR-regulated genes *CAL2*, *ERO1*, *PDI6*, and *Rb60* (D) or the oxidative stress-related genes *GSTS1* and *GPXH* (E) were analyzed by qPCR. Values are means of three independent experiments.

that autophagy might be partially suppressed by GSH. Interestingly, ER stress was also decreased by exogenous GSH in DTT-treated cells, which was revealed by the lower expression of *PDI6* (Fig. 4A) and other ER stress-induced genes (Supplemental Fig. S5A). Because GSH decreased both ER stress and autophagy, it was not possible to separate these two processes, and therefore, down-regulation of autophagy might be caused by the partial suppression of ER stress or might be caused by ROS scavenging or redox signaling mechanisms dependent on GSH. Thus, additional investigation of the role of oxidative stress in the control of ER stress-induced autophagy should be performed under experimental conditions, where ER stress and oxidative stress can be independently tested. We found

that GSH was also able to partially suppress tunicamycin-induced expression of *ATG8*. However, unlike DTT, GSH did not significantly decrease the tunicamycin-induced expression of ER stress markers (Fig. 4B; Supplemental Fig. S5B). In agreement with decreased *ATG8* transcription, the abundance of the ATG8 protein was also down-regulated in cells treated with both tunicamycin and GSH compared with cells treated only with tunicamycin (Fig. 4C). Moreover, when the GSH concentration was increased from 5 to 10 mM, a stronger decrease of ATG8 protein level was observed (Fig. 4D). To analyze the specificity of the response to GSH, we also investigated whether ascorbate, an abundant metabolite in plant cells with antioxidant properties (Foyer and Noctor, 2011), is able to mitigate the increase of ATG8 protein level caused

**Figure 4.** GSH partially prevents ER stress-induced autophagy. Log-phase cells grown in TAP medium were treated with 2.5 mM DTT (A) or 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin (B) alone or combined with 10 mM GSH. After 8 h of treatment, cells were processed for expression analysis of *ATG8* and *PDI6* genes by qPCR. Values are means of three independent experiments. \*, Differences were significant at  $P < 0.05$  according to Student's *t* test between DTT and DTT-GSH or tunicamycin and tunicamycin-GSH. C and D, Western-blot analyses of ATG8 and FKBP12 proteins in log phase cells treated with 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin, 5 to 10 mM GSH, 2 mM ascorbate (asc), or combinations of these compounds. Thirty micrograms of total extracts were resolved by 15% SDS-PAGE followed by western blotting with anti-CrATG8 and anti-CrFKBP12 antibodies. tun, Tunicamycin.



by tunicamycin, but unlike GSH, no effect was observed on ATG8 abundance (Fig. 4C). We found, however, that ascorbate potently and rapidly increased the expression of *GST1*, indicating that this antioxidant is acting on the expression of some genes (Supplemental Fig. S6).

The effect of GSH on ER stress-induced autophagy was also examined by immunolocalization assays of ATG8 in *C. reinhardtii* cells. As previously shown (Pérez-Pérez et al., 2010), tunicamycin treatment strongly increased the ATG8 signal, which accumulated in a few intense spots (Fig. 5A). However, the presence of GSH in the culture medium significantly decreased the intensity of the ATG8 signal, although some spots were still clearly visible, indicating that autophagy was reduced but not fully abolished in these cells (Fig. 5A). Quantification of the immunofluorescence signal from individual cells confirmed the inhibitory effect of GSH on autophagy induced by ER stress (Fig. 5B). These results are in close agreement with qPCR and western-blot assays of ATG8 performed in tunicamycin-treated cells in the presence of exogenous GSH (Fig. 4) and strongly suggest that oxidative stress might be involved in the induction of autophagy in ER-stressed cells.

#### Glutathione Decreases the Toxicity of Tunicamycin in *C. reinhardtii*

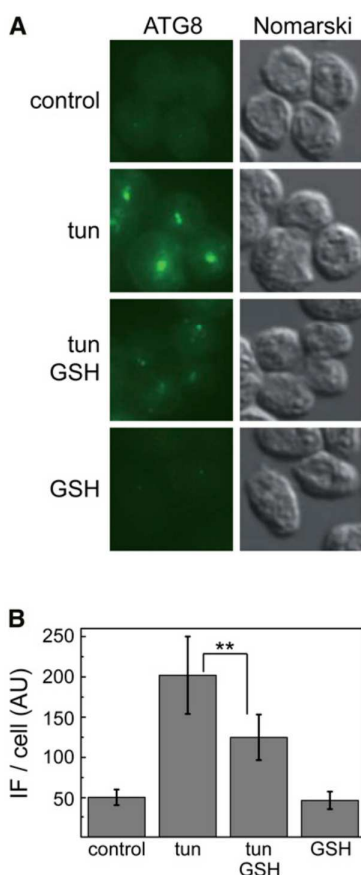
Protein glycosylation in the ER is essential for cell growth, and thus, its inhibition by tunicamycin is toxic for the cell. Indeed, we found that tunicamycin reduced cell viability in *C. reinhardtii* after 24 h of treatment (Fig. 6A). Our results indicated that the presence of exogenous GSH in the medium decreased the toxicity of

tunicamycin, which was revealed by Evans blue staining (Fig. 6A) or serial spot dilution assays (Fig. 6B). Interestingly, cells were still fully viable at the time of autophagy activation by tunicamycin (6–8 h; Fig. 6A), supporting a prosurvival role of this catabolic process in response to ER stress. In relation to the effect of tunicamycin on cell viability, we analyzed the expression of the *DAD1* gene, a homolog of defender against apoptotic cell death1 that is conserved in many eukaryotes, including *C. reinhardtii* (Kelleher and Gilmore, 1994, 1997; Gallois et al., 1997; Moharikar et al., 2007). The *DAD1* protein is part of the oligosaccharyltransferase complex and seems to play an important role in N-linked glycosylation in the ER (Kelleher and Gilmore, 1994), a process specifically inhibited by tunicamycin. Our results revealed that *DAD1* expression was up-regulated on prolonged exposure (48 h) to tunicamycin (Fig. 6C), when cell viability is significantly compromised (Fig. 6A). No induction of *DAD1* was observed in cells treated with tunicamycin for 6 h (Supplemental Fig. S7), indicating that *DAD1* expression is associated to tunicamycin-induced loss of cell viability. In agreement with the protective role of GSH on cell growth in ER-stressed cells, the presence of this antioxidant decreased tunicamycin-mediated *DAD1* expression (Fig. 6C).

#### The *sor1* Mutant Displays Increased Autophagy in Response to ER Stress

To further investigate the redox regulation of ER stress-induced autophagy in *C. reinhardtii*, we analyzed the activation of this degradative pathway by tunicamycin in the *sor1* mutant. This strain lacks the





**Figure 5.** GSH decreases tunicamycin-induced cellular accumulation of ATG8 in *C. reinhardtii*. A, Immunolocalization of ATG8 in *C. reinhardtii* cells treated for 8 h with  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin alone or combined with 10 mM GSH. Bar =  $5 \mu\text{m}$ . B, Quantification of the immunofluorescence (IF) signal detected in individual cells from the experiment described in A. For each condition, a minimum of 100 individual cells was analyzed using ImageJ software. tun, Tunicamycin. \*\*, Differences were significant at  $P < 0.01$  according to Student's *t* test between tunicamycin and tunicamycin GSH.

Singlet Oxygen Resistant1 (SOR1) protein, a putative bZIP transcription factor that controls the expression of a large number of oxidative stress response and detoxification genes, including *GSTS1* (Fischer et al., 2012). Treatment of *sor1* cells with tunicamycin revealed a more pronounced accumulation of the ATG8 protein in the *sor1* mutant compared with wild-type cells (Fig. 7A), suggesting a higher induction of autophagy in this mutant in response to ER stress. Expression analysis of the *ATG8* gene also showed a higher response to tunicamycin in *sor1* compared with *cw15* cells (Fig. 7B). As previously reported (Fischer et al., 2012), we found that *sor1* mutant cells show a constitutively higher expression of *GSTS1* (Fig. 7B). Interestingly, despite this elevated expression, tunicamycin further increased *GSTS1* mRNA abundance in the *sor1* mutant (Fig. 7B). Taken together, these results strongly suggested that autophagic activity

triggered by ER stress is higher in cells with anomalous expression of oxidative stress-related genes.

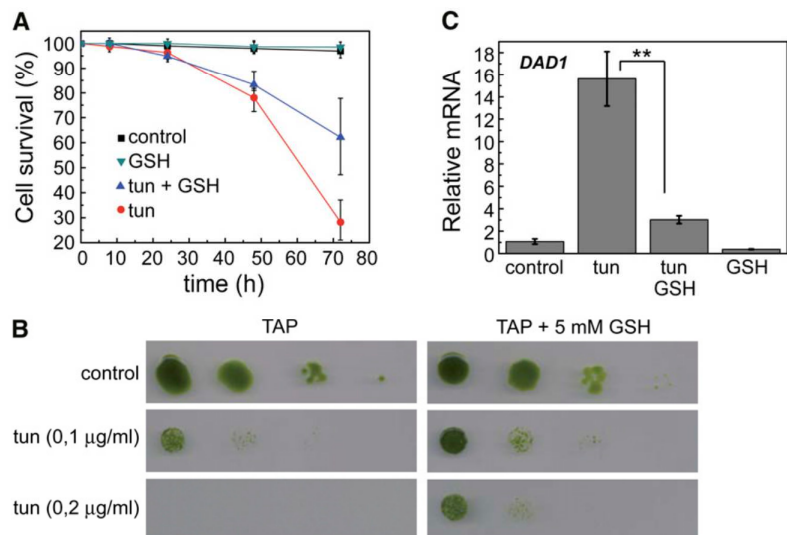
## DISCUSSION

In a previous report, we showed that ER stress induces autophagy in *C. reinhardtii* (Pérez-Pérez et al., 2010). In this study, we show that ER stress mediated by tunicamycin or DTT treatment strongly increased the expression of the *ATG8* gene, which is in agreement with the pronounced accumulation of the ATG8 protein and its modified forms detected in ER-stressed cells (Figs. 1 and 3). Induction of autophagy by ER stress is evolutionarily conserved and has been reported in yeast (Bernales et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006), mammals (Ogata et al., 2006), and more recently, plants (Liu et al., 2012). Studies performed in yeast strongly suggest that autophagy serves to counterbalance ER expansion that occurs as a consequence of UPR signaling (Bernales et al., 2006). Degradation of ER membranes by autophagy during ER stress is conserved in plants, because this type of membrane has been detected inside autophagic bodies in *Arabidopsis* plants treated with tunicamycin (Liu et al., 2012).

This study also showed that the accumulation of unfolded proteins in the ER triggers oxidative stress in *C. reinhardtii*. Formation of disulfide bonds in the ER and associated oxidative protein folding are linked to the generation of hydrogen peroxide by the activity of the ERO1 oxidoreductase that catalyzes the reoxidation and activation of PDI (Tu and Weissman, 2004). Originally identified in yeast (Frand and Kaiser, 1998; Pollard et al., 1998), ERO1 is widely conserved in all eukaryotes, including plants (Aller and Meyer, 2013). In this study, we found that ERO1 is conserved in *C. reinhardtii* and that its expression is highly induced by the ER stressors tunicamycin and DTT (Figs. 1 and 3). ERO1 is a hydrogen peroxide-generating enzyme, and its high expression may lead to increased levels of hydrogen peroxide under ER stress. Indeed, our results indicated that *C. reinhardtii* cells subjected to ER stress displayed elevated expression of oxidative stress-related genes and higher levels of the intracellular pool of GSSG (Figs. 2, B and C and 3E). Thus, different lines of evidence indicate that ER stress triggers oxidative stress in *C. reinhardtii*. In yeast, ROS, such as hydrogen peroxide, are generated during ER stress, and overexpression of ERO1 causes a significant increase in ROS and GSSG pool, suggesting that up-regulation of the oxidative protein folding machinery by the UPR contributes to ROS accumulation (Haynes et al., 2004). In a recent report, it has also been shown that ER stress triggers ROS signaling in plants (Ozgur et al., 2014), indicating that ROS production on ER stress is widely conserved.

In addition to *ERO1*, we identified other genes subjected to UPR regulation in *C. reinhardtii*. The expression levels of two PDI genes, *Rb60* and *PDI6*, and the *CAL2* chaperone were increased in response to ER stress (Figs. 2 and 4). *Rb60* is a canonical PDI with an atypical

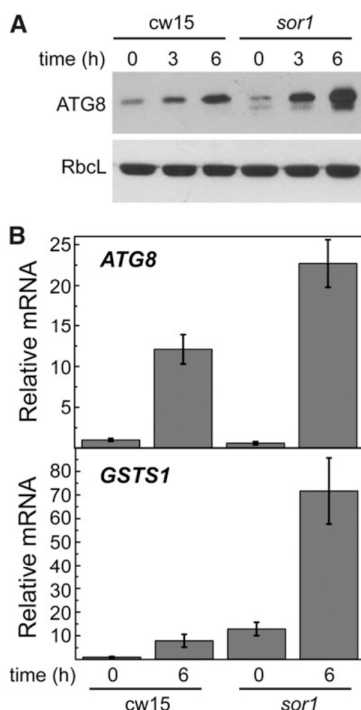
**Figure 6.** GSH reduces the toxicity of tunicamycin in *C. reinhardtii*. A, Log-phase cells grown in TAP medium were treated with tunicamycin ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), GSH (10 mM), or both compounds combined. Untreated cells were used as control. Cell viability was determined by Evans blue staining at the indicated times. Results are means of four independent experiments. B, Cells were subjected to 10-fold serial dilutions and spotted onto TAP plates containing the indicated concentrations of tunicamycin and GSH. Plates were grown at  $25^\circ\text{C}$  under continuous illumination for 5 d. C, Expression analysis of the *DAD1* gene by qPCR. Log-phase cells were treated with  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin alone or combined with 10 mM GSH for 48 h and then processed for RNA isolation and analysis. Values are means of three independent experiments. tun, Tunicamycin. \*\*, Differences were significant at  $P < 0.01$  according to Student's *t* test between tunicamycin and tunicamycin-GSH.



dual localization in the ER and the chloroplast (Levitan et al., 2005), where it regulates *psbA* translation by light (Danon and Mayfield, 1991). The function of Rb60 in the ER is unclear, although based on its high identity to classical PDI and its localization, it likely participates in oxidative protein folding in the ER. *PDI6* encodes a PDI-like protein containing an N-terminal J domain that is conserved among ER cochaperones (Schroda, 2004) and a C-terminal Arg-rich domain involved in ER stress quality control in mammals (Mizobuchi et al., 2007). The domain architecture of *PDI6* seems to be well conserved in microalgae and less represented in plants, where the J domain-containing protein ATERDJ3A from *Arabidopsis* seems to be the closest homolog (Supplemental Fig. S3). No clear homologs of this protein have been found in yeasts or humans. Our results revealed that *PDI6* mRNA levels are particularly sensitive to ER stress, and a massive increase in the expression of this gene was observed with tunicamycin or DTT (Figs. 1, 3, and 4). Expression of the calreticulin *CAL2* gene was also found to be up-regulated by the UPR in *C. reinhardtii* (Figs. 1, 3, and 4). Similar to *ERO1*, *CAL2* is conserved in plants and other systems (Supplemental Fig. S3), and microarray analysis of *Arabidopsis* seedlings treated with tunicamycin or DTT suggested that this gene is up-regulated under ER stress conditions (Martínez and Chrispeels, 2003). Our results indicate that the abundance of *ERO1*, *Rb60*, *PDI6*, or *CAL2* mRNAs can be used as markers of the UPR in *C. reinhardtii* and strongly suggest that the mechanisms of oxidative protein folding described in other eukaryotes are conserved in green algae.

Given that autophagy is regulated by ROS (Pérez-Pérez et al., 2012b) and ER stress triggers oxidative

stress responses in *C. reinhardtii* (Fig. 2), ER stress-derived ROS may likely contribute to autophagy regulation in response to this stress (Fig. 8). In close agreement with this hypothesis, we found that the antioxidant GSH down-regulates autophagy in ER-stressed cells (Figs. 4 and 5). Glutathione is the main free soluble thiol in the cell and acts as a redox buffer by maintaining the intracellular environment in a reduced state (Foyer and Noctor, 2011). Moreover, glutathione has also been shown to play a protective role from ER-generated oxidative stress. Prolonged UPR activation in a yeast strain that is genetically predisposed to sustained ER stress causes oxidative stress, ultimately leading to cell death (Haynes et al., 2004). In this strain, the presence of GSH in the culture medium relieved oxidative stress and prevented cell death without diminishing UPR activation, indicating that ROS accumulate during ER stress and are toxic for the cell (Haynes et al., 2004). The effect of GSH in alleviating oxidative stress and promoting growth of ER-stressed cells might be conserved in *C. reinhardtii*, because our results showed that GSH decreases the toxicity of tunicamycin (Fig. 6). The protective role of GSH was emphasized by the finding that this antioxidant decreased the expression of the *DAD1* gene, which is specifically up-regulated when cell viability is compromised because of prolonged ER stress (Fig. 6C). *DAD1* is a putative antiapoptotic gene widely conserved in eukaryotes, including humans, plants, yeasts, and algae (Nakashima et al., 1993; Kelleher and Gilmore, 1994, 1997; Gallois et al., 1997; Moharikar et al., 2007). The *DAD1* protein is localized in the ER and forms part of the oligosaccharyltransferase complex, which catalyzes N-linked glycosylation (Kelleher and Gilmore, 1994). Although the precise function of this protein is not clear, *DAD1* seems



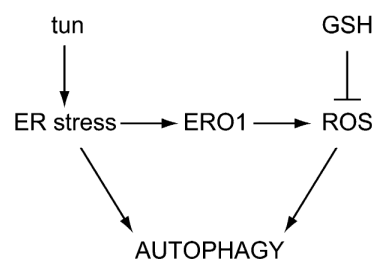
**Figure 7.** The *sor1* mutant displays increased autophagy in response to ER stress. A, Log-phase *cw15* and *sor1* cells were treated with tunicamycin ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), and at the indicated times, samples were taken and processed for western-blot analysis. B, Expression analysis of *ATG8* and *GSTS1* genes by qPCR. Log-phase *cw15* and *sor1* cells were treated with tunicamycin ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 6 h and subsequently subjected to RNA isolation and analysis. Values are means of three independent experiments. RbcL, Rubisco large subunit.

to be involved in preventing cell death and regulating N-linked glycosylation. Our results are in agreement with these putative roles, because expression of the *C. reinhardtii* *DAD1* gene is induced by tunicamycin treatment, which is toxic for the cell and specifically inhibits N-linked glycosylation.

The hypothesis that ER stress-induced autophagy and redox signaling are linked was strengthened by the finding that tunicamycin triggers autophagy more potently in *sor1* mutant cells (Fig. 7). The *sor1* strain was isolated in a screen for mutants with increased tolerance to singlet oxygen and shows a constitutively higher expression of a large number of oxidative stress response and detoxification genes (Fischer et al., 2012). Mapping of the *sor1* mutation identified a putative bZIP transcription factor denoted as SOR1 that controls, among other things, the expression of the glutathione S-transferase gene *GSTS1* (Fischer et al., 2012), which is up-regulated in ER-stressed cells (Fig. 2B). The high autophagic activity observed in *sor1* mutant cells treated with tunicamycin might be related to the enhanced expression of ROS-induced genes reported in this mutant, because our results indicated that ER stress-induced

autophagy is linked to redox signaling in *C. reinhardtii* (Figs. 2, 4, and 5). Given the role of SOR1 in the control of glutathione-based ROS scavenging by regulating the expression of genes, such as *GSTS1* or *GPXH* (Fischer et al., 2012), and the regulatory function of this antioxidant in ER stress-induced autophagy (Figs. 4 and 5), it is possible that the up-regulation of autophagy observed in the *sor1* mutant is related to the high expression of these genes, which may result in reduced intracellular levels of glutathione in *sor1* cells.

Overall, our results indicate that ER stress triggers autophagy and oxidative stress in *C. reinhardtii*. Under ER stress triggered by tunicamycin, GSH was found to decrease autophagy induction, whereas UPR markers remained unaffected. This uncoupling of UPR and autophagy in the presence of an antioxidant participating in diverse ROS scavenging mechanisms suggests that ROS production may participate in the control of ER stress-induced autophagy in *C. reinhardtii* (Fig. 8). However, GSH effects on ER stress may involve other mechanisms not associated with ROS scavenging. For example, given the protective role that glutathione plays in the ER (Haynes et al., 2004), it may also be possible that glutathione specifically regulates autophagy by restoring the GSH-to-GSSG ratio in the ER, which is critical for maintaining the functionality and redox balance at this cellular compartment. Glutathione or redox imbalance may also play a signaling role during ER stress (e.g. through glutathionylation of specific target proteins; Zaffagnini et al., 2012). In this work, we have established the importance of the intracellular redox state and glutathione during ER stress-induced autophagy. Additional studies will be required to unravel how redox active molecules control autophagy induction and examine the interplay between these mechanisms and other ER stress signaling pathways.



**Figure 8.** Control of autophagy by ER stress and ER-derived ROS in *C. reinhardtii*. Tunicamycin (tun) treatment results in toxic accumulation of unfolded proteins in the ER, leading to autophagy activation as a defensive mechanism. ER stress also increases ROS production in the ER by de oxidoreductase ERO1, which contributes to the up-regulation of autophagy. The antioxidant properties of GSH counterbalance ROS signaling to the autophagic machinery but do not abrogate ER stress, resulting in partial inactivation of autophagy.



## MATERIALS AND METHODS

### Strains and Growth Conditions

*Chlamydomonas reinhardtii* cell wall-deficient cw15 4B+ and *sor1* mutant strains were obtained from the *Chlamydomonas* Culture Collection. *C. reinhardtii* cells were grown under continuous illumination at 25°C in Tris-acetate phosphate (TAP) medium as described (Harris, 1989). When required, cells in exponential growth phase ( $10^6$  cells per milliliter) were treated with  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  tunicamycin (654380; Calbiochem) from  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  stock in dimethylformamide,  $2.5 \text{ mM}$  DTT (A2948; Applchem),  $1 \text{ mM}$  hydrogen peroxide (H1009; Sigma-Aldrich),  $1 \mu\text{M}$  MV (85617-7; Sigma-Aldrich), or  $20 \mu\text{M}$  norflurazon (PS1044; Sigma-Aldrich).

### Gene Accession Numbers

*C. reinhardtii* genes analyzed in this study were identified at the Phytozome Web site (<http://www.phytozome.net/cgi-bin/gbrowse/chlamy/>) under the following accession numbers: *ATG3*, Cre02.g102350.t1.2; *ATG8*, Cre16.g689650.t1.2; *CAL2*, Cre01.g038400.t1.2; *ERO1*, Cre17.g723150.t1.3; *PD16*, Cre12.g518200.t1.3; *Rb60*, Cre02.g088200.t1.2; *GPXH*, Cre10.g458450.t1.3; *GST1*, Cre16.g688550.t1.2; and *DAD1*, Cre02.g108400.t1.2.

### RNA Isolation and Quantification

*C. reinhardtii* total RNA was isolated from frozen cell pellets as previously described (Crespo et al., 2005). First strand complementary DNA was produced using  $2 \mu\text{g}$  of total RNA, oligo(dT) primer, and 100 units of SuperScript II RNase H reverse transcription (18064-014; Invitrogen) in a  $50\text{-}\mu\text{L}$  reaction. Reverse transcription qPCR was performed with a StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems). PCR reactions, in a final volume of  $20 \mu\text{L}$ , contained  $10 \mu\text{L}$  of FastStart Universal SYBR Green Master (04913850001; Roche),  $1 \mu\text{L}$  of complementary DNA dilution,  $250 \text{ nm}$  each primer, and distilled water up to  $20 \mu\text{L}$ . Conditions used for amplification in the thermocycler were preincubation at  $95^\circ\text{C}$  for 10 min followed by 40 cycles of denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 15 s and annealing and elongation at  $55^\circ\text{C}$  to  $58^\circ\text{C}$  (depending on the gene analyzed) for 60 s. All reactions were performed in triplicate with two of four biological replicates. The CBLP gene was used as a control constitutively expressed gene (Pootakham et al., 2010). The primer pairs used for qPCR were 5'-CTTCTCGCCCATGACCAC-3' and 5'-CCCACCAG-GTTGTTCTTCAG-3' for *CBLP*, 5'-CGAGTTCAGGTCGAGCAGT-3' and 5'-CCACCCACAGACATGGGTGA-3' for *ATG3*, 5'-TCCCGATATCGACA-AGAAG-3' and 5'-TGCGGATGACGTACACAAAT-3' for *ATG8*, 5'-ACCC-TGACTACGTCCACGAC-3' and 5'-GTCCTCAGCGAAGTCTCTGG-3' for *CAL2*, 5'-TGTC AACCTGCTCATCAACC-3' and 5'-CTGCTGCTGCTACTGCTGTC-3' for *ERO1*, 5'-GGTGTGGCTGGTTGAGTCT-3' and 5'-CTCTTTGGCGTCTCA-CAGT-3' for *PD16*, 5'-CCAAGCGCTTAAAGAAGGTG-3' and 5'-GTAGG-GAAGCCCTTGACCTC-3' for *Rb60*, 5'-AGGTCTGGATGCGTTCCTA-3' and 5'-ACACAGTCAGGGCGGAAGAAG-3' for *DAD1*, 5'-GCGGTGCGCAATAAC-CAAT-3' and 5'-AAGGCTGTCCGAAAGC-3' for *GPXH* (Fischer et al., 2009), 5'-CTGACCATCAGCCACGACT-3' and 5'-ACATCGAACACAGGGTAGC-3' for *FKBP12*, and 5'-CAGAGGTGAAGGCGGATAC-3' and 5'-GTGTTGCA-ATGGACTTCAGC-3' for *GST1* (Fischer et al., 2012).

### Protein Preparation and Immunoblot Analysis

*C. reinhardtii* cells from liquid cultures were collected by centrifugation ( $4,000g$  for 5 min), washed one time in  $50 \text{ mM}$  Tris-HCl (pH 7.5) buffer, and resuspended in a minimal volume of the same solution. Cells were lysed by two cycles of slow freezing to  $-80^\circ\text{C}$  followed by thawing at room temperature. The soluble cell extract was separated from the insoluble fraction by centrifugation ( $15,000g$  for 15 min) in a microcentrifuge at  $4^\circ\text{C}$ . For immunoblot analyses, total protein extracts ( $30 \mu\text{g}$ ) were subjected to 15% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes (162-0115; Bio-Rad). Anti-CrATG8 (Pérez-Pérez et al., 2010) and secondary antibodies were diluted 1:2,500 and 1:10,000, respectively, in PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (A4974; Applchem) and 5% (w/v) milk powder. The ECL-Plus immunoblotting detection system (RPN2132; GE Healthcare) was used to detect the proteins with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibodies (A6154; Sigma-Aldrich). Anti-FKBP12 antibody was diluted 1:3,000 and used as the loading control as described previously (Crespo et al., 2005). Proteins were quantified

with the Coomassie Brilliant Blue dye-binding method as described by the manufacturer (500-0006; Bio-Rad).

### Glutathione Determination

*C. reinhardtii* cells were collected by centrifugation ( $5,000g$  for 5 min), washed one time in  $50 \text{ mM}$  sodium phosphate (pH 7.5) buffer, resuspended in  $0.2 \text{ N}$  HCl, and lysed by two cycles of frozen-thawed at  $-80^\circ\text{C}$ . Crude extracts were cleared by centrifugation at  $15,000g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ , and  $500 \mu\text{L}$  of sample was neutralized by adding  $50 \mu\text{L}$  of  $50 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.5) and  $0.2 \text{ N}$  NaOH to a final pH between 5 and 6. The neutralized sample was directly used for measuring total glutathione (GSH plus GSSG) by the recycling assay initially described by Tietze (1969) and adapted by Queval and Noctor (2007). The method relies on the glutathione reductase-dependent reduction of 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoic acid) (DTNB; D8130; Sigma). GSSG was measured after treatment of the neutralized sample with  $10 \text{ mM}$  4-vinylpyridine (V320-4; Sigma) for 30 min at  $25^\circ\text{C}$ . To remove excess 4-vinylpyridine, the derivatized sample was centrifuged two times at  $15,000g$  for 20 min at  $4^\circ\text{C}$ . To measure total glutathione or GSSG, sample was added to a mix containing  $120 \text{ mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.5),  $300 \mu\text{M}$  DTNB,  $500 \mu\text{M}$  NADPH,  $1 \text{ mM}$  EDTA (pH 8), and 1 units  $\text{mL}^{-1}$  glutathione reductase (G3664; Sigma), and DTNB reduction was measured at  $412 \text{ nm}$ . Different GSH (G4251; Sigma) concentrations ranging from 0 to  $5 \mu\text{M}$  were used as standards.

### Viability Assay

Cell viability was estimated by determining the percentage of *C. reinhardtii* cells that excluded Evans blue dye (E2129; Sigma), which only stains nonviable cells;  $450 \mu\text{L}$  of *C. reinhardtii* cells was incubated with 0.1% (w/v) Evans blue for 5 min, washed one time with  $500 \mu\text{L}$  of TAP medium, and resuspended in an equal volume of TAP medium. Cells were examined in a phase contrast microscope to visualize uptake of the dye.

### Fluorescence Microscopy

*C. reinhardtii* cells were fixed and stained for immunofluorescence microscopy as previously described (Díaz-Troya et al., 2008a; Pérez-Pérez et al., 2010). Affinity-purified polyclonal anti-ATG8 was used as the primary antibody at 1:500 dilution. For signal detection, a fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-rabbit antibody (1:500; F4890; Sigma-Aldrich) was used. Preparations were photographed on a DM6000B microscope (Leica) with an ORCA-ER camera (Hamamatsu) and processed with the Leica Application Suite Advanced Fluorescence software package (Leica). For the comparative analysis of the fluorescein isothiocyanate signal from different samples, the same acquisition time was fixed. Immunofluorescence signals in individual cells were quantified using the ImageJ software.

### Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

**Supplemental Figure S1.** Analysis of autophagy induction by different stress conditions in *C. reinhardtii*.

**Supplemental Figure S2.** Expression analysis of the *FRKB12* gene by qPCR.

**Supplemental Figure S3.** Domain structure and amino acid sequence analysis of *CAL2*, *ERO1*, and *PD16* proteins from *C. reinhardtii*.

**Supplemental Figure S4.** Effect of thapsigargin on autophagy and ER stress.

**Supplemental Figure S5.** Expression analysis of *CAL2*, *ERO1*, and *Rb60* genes by qPCR.

**Supplemental Figure S6.** Expression analysis of the *GST1* gene by qPCR in cells treated with ascorbate.

**Supplemental Figure S7.** *DAD1* expression is up-regulated upon prolonged ER stress.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Francisco J. Florencio for helpful discussions and advice.

Received May 26, 2014; accepted August 19, 2014; published August 20, 2014.

## LITERATURE CITED

- Aller I, Meyer AJ (2013) The oxidative protein folding machinery in plant cells. *Protoplasma* **250**: 799–816
- Avin-Wittenberg T, Honig A, Galili G (2012) Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* **249**: 285–299
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2–11
- Bernales S, McDonald KL, Walter P (2006) Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**: e423
- Crespo JL, Díaz-Troya S, Florencio FJ (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **139**: 1736–1749
- Danon A, Mayfield SP (1991) Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *EMBO J* **10**: 3993–4001
- Díaz-Troya S, Florencio FJ, Crespo JL (2008a) Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **7**: 212–222
- Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2008b) The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**: 851–865
- Filonova A, Haensch P, Gebauer C, Weisheit W, Wagner V (2013) Protein disulfide isomerase 2 of *Chlamydomonas reinhardtii* is involved in circadian rhythm regulation. *Mol Plant* **6**: 1503–1517
- Fischer BB, Dayer R, Schwarzenbach Y, Lemaire SD, Behra R, Liedtke A, Eggen RI (2009) Function and regulation of the glutathione peroxidase homologous gene GPXH/GPX5 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* **71**: 569–583
- Fischer BB, Dayer R, Wiesendanger M, Eggen RIL (2007) Independent regulation of the GPXH gene expression by the primary and secondary effects of high light stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Physiol Plant* **130**: 195–206
- Fischer BB, Turford HK, Wakao S, Huang SG, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, Koller A, Eggen RI, Niyogi KK (2012) SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: E1302–E1311
- Foyer CH, Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant Physiol* **155**: 2–18
- Fränd AR, Kaiser CA (1998) The ERO1 gene of yeast is required for oxidation of protein dithiols in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **1**: 161–170
- Fränd AR, Kaiser CA (1999) Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **4**: 469–477
- Gallois P, Makishima T, Hecht V, Despres B, Laudé M, Nishimoto T, Cooke R (1997) An Arabidopsis thaliana cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. *Plant J* **11**: 1325–1331
- Harris EH (1989) The *Chlamydomonas* Sourcebook. Academic Press, San Diego
- Haynes CM, Titus EA, Cooper AA (2004) Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Mol Cell* **15**: 767–776
- Huang J, Lam GY, Brumell JH (2011) Autophagy signaling through reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **14**: 2215–2231
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, et al (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488–492
- Kelleher DJ, Gilmore R (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J Biol Chem* **269**: 12908–12917
- Kelleher DJ, Gilmore R (1997) DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4994–4999
- Ledford HK, Chin BL, Niyogi KK (2007) Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **6**: 919–930
- Lemaire SD, Miginiac-Maslow M (2004) The thioredoxin superfamily in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* **82**: 203–220
- Levitani A, Trebitsh T, Kiss V, Pereg Y, Dangoor I, Danon A (2005) Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6225–6230
- Li F, Vierstra RD (2012) Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* **17**: 526–537
- Li L, Ishdorj G, Gibson SB (2012) Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med* **53**: 1399–1410
- Liu Y, Bassham DC (2012) Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 215–237
- Liu Y, Burgos JS, Deng Y, Srivastava R, Howell SH, Bassham DC (2012) Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 4635–4651
- Malhotra JD, Kaufman RJ (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid Redox Signal* **9**: 2277–2293
- Martínez IM, Chrispeels MJ (2003) Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell* **15**: 561–576
- Mizobuchi N, Hoseki J, Kubota H, Toyokuni S, Nozaki J, Naitoh M, Koizumi A, Nagata K (2007) ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. *Cell Struct Funct* **32**: 41–50
- Moharikar S, D'Souza JS, Rao BJ (2007) A homologue of the defender against the apoptotic death gene (dad1) in UV-exposed *Chlamydomonas* cells is downregulated with the onset of programmed cell death. *J Biosci* **32**: 261–270
- Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A, Fukushima K, Shibata Y, Komiyama S, Nishimoto T (1993) Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol Cell Biol* **13**: 6367–6374
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 458–467
- Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, et al (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **26**: 9220–9231
- Ozgur R, Turkan I, Uzilday B, Sekmen AH (2014) Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **65**: 1377–1390
- Pérez-Pérez ME, Couso I, Crespo JL (2012a) Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* **8**: 376–388
- Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Crespo JL (2010) Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **152**: 1874–1888
- Pérez-Pérez ME, Lemaire SD, Crespo JL (2012b) Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant Physiol* **160**: 156–164
- Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS (1998) Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* **1**: 171–182
- Pootakham W, Gonzalez-Ballester D, Grossman AR (2010) Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **153**: 1653–1668
- Queval G, Noctor G (2007) A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal Biochem* **363**: 58–69
- Rutkowski DT, Kaufman RJ (2007) That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci* **32**: 469–476
- Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, Laurindo FR (2009) Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* **11**: 2409–2427
- Scherz-Shouval R, Elazar Z (2011) Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* **36**: 30–38

- Schroda M** (2004) The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth Res* **82**: 221–240
- Szumiel I** (2011) Autophagy, reactive oxygen species and the fate of mammalian cells. *Free Radic Res* **45**: 253–265
- Thompson AR, Vierstra RD** (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 165–173
- Tietze F** (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**: 502–522
- Tu BP, Weissman JS** (2004) Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *J Cell Biol* **164**: 341–346
- Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D** (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**: 664–666
- Walter P, Ron D** (2011) The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**: 1081–1086
- Xie Z, Klionsky DJ** (2007) Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**: 1102–1109
- Yorimitsu T, Nair U, Yang Z, Klionsky DJ** (2006) Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *J Biol Chem* **281**: 30299–30304
- Zaffagnini M, Bedhomme M, Marchand CH, Morisse S, Trost P, Lemaire SD** (2012) Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* **16**: 567–586

#### **4.1.1 Material suplementario.**

## Supplementary material

**SFig. 1.** Analysis of autophagy induction by different stress conditions in *Chlamydomonas*. (A), Log phase cells growing in TAP medium were treated with 5 µg/ml tunicamycin (tun), 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1 µM methyl viologen (MV) or 20 µM norflurazon (NF) and samples were taken at the indicated times and processed for expression analysis of *ATG8*, *ATG3* and *CAL2* genes by qPCR. Values are means of three independent experiments. (B), Thirty micrograms of total extracts from cells treated as indicated in panel A were resolved by 15% SDS-PAGE followed by western blot analysis with anti-ATG8 and anti-FKBP12 antibodies.

**SFig. 2.** Expression analysis of the *FKBP12* gene by qPCR. Log phase cells grown in TAP medium were treated with 5 µg/ml tunicamycin (tun) and samples were collected and processed for RNA isolation at the indicated times. Expression of the *FKBP12* gene was analyzed by qPCR. Values are means of two independent experiments.

**SFig. 3.** (A) Domain structure of CAL2, ERO1 and PDI6 proteins from *Chlamydomonas*. Evolutionarily conserved domains were identified with the Conserved Domain search tool at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). (B) Amino acid sequence alignment of CAL2 protein homologues from *Chlamydomonas reinhardtii* (CrCAL2; Cre01.g038400.t1.2), *Arabidopsis thaliana* (AtCAL2; NP\_172392.1), human (HsCAL2; AAB51176.1) and *Saccharomyces cerevisiae* (CNE1). ER retention motifs are underlined. (C) Amino acid sequence alignment of ERO1 protein homologues from *Chlamydomonas reinhardtii* (CrERO1; Cre17.g723150.t1.3), *Arabidopsis thaliana* (AtERO1; AEE35298.1), human (HsERO1; AAH08674.1) and *Saccharomyces cerevisiae* (ScERO1). (D) Amino acid sequence alignment of PDI6 protein homologues from

*Chlamydomonas reinhardtii* (CrPDI6; Cre12.g518200.t1.3), *Volvox carteri* (VcPDI6; XP\_002948079.1), *Chlorella variabilis* (CvPDI6; XP\_005852011.1) and *Arabidopsis thaliana* (AtATERDJ3A; NP\_187509.1). The thioredoxin-like motif is underlined.

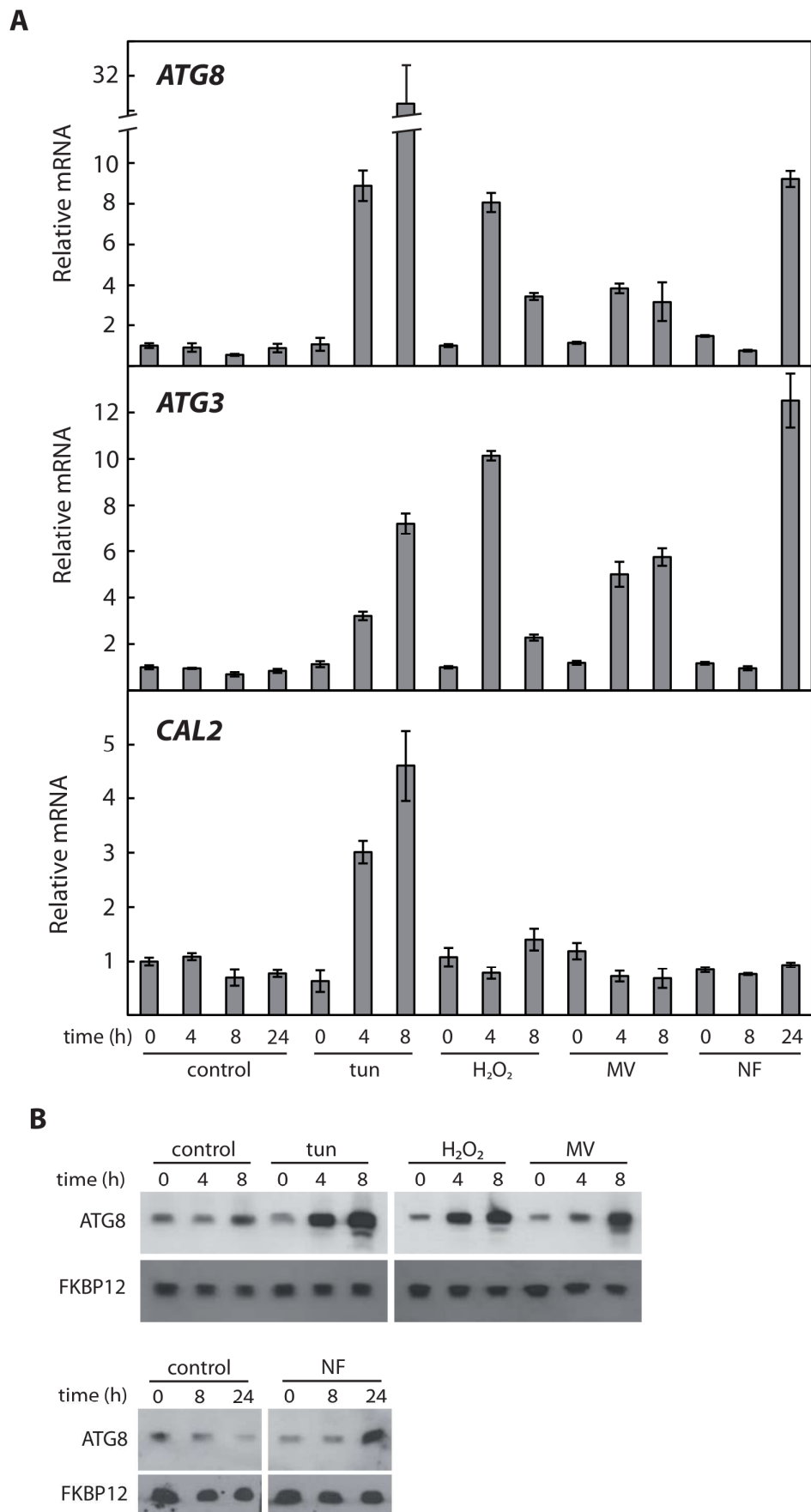
**SFig. 4.** Effect of thapsigargin on autophagy and ER stress. Log phase cells grown in TAP medium were treated with 1 µg/ml thapsigargin (thap) or 5 µg/ml tunicamycin (tun) for 8 hours and then processed for western blot analysis of ATG8 and FKBP12 proteins (A) or qPCR analysis of *ATG8*, *ERO1* and *PDI6* genes (B). Values are means of two independent experiments.

**SFig. 5.** Expression analysis of *CAL2*, *ERO1* and *Rb60* genes by qPCR. Log phase cells grown in TAP medium were treated for 8 hours with 2.5 mM DTT (A) or 5 µg/ml tunicamycin (B) alone or in combination with 10 mM GSH. Samples were collected and processed for RNA isolation. Expression of the indicated genes was analyzed by qPCR. Values are means of three independent experiments. “\*”, Differences were significant at  $P < 0.05$  according to Student’s t-test between DTT and DTT/GSH.

**SFig. 6.** Expression analysis of the *GSTS1* gene by qPCR. Log phase cells grown in TAP medium were treated for 30 minutes or 8 hours with 5 mM ascorbate or left untreated (control). Samples were collected and processed for RNA isolation and qPCR analysis. Values are means of two independent experiments.

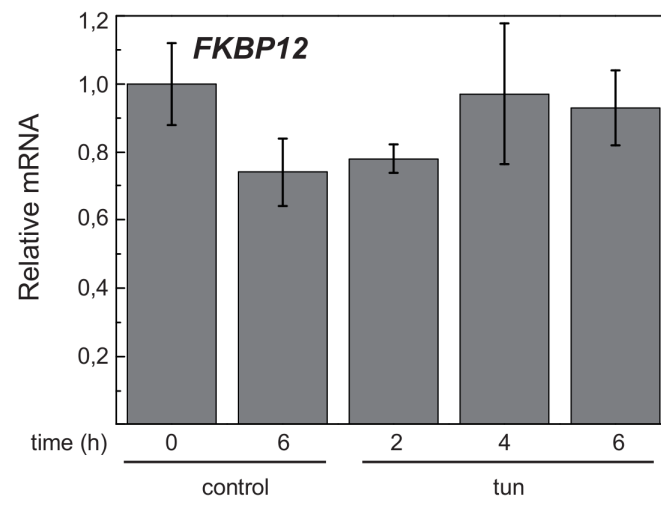
**SFig. 7.** *DAD1* expression is upregulated upon prolonged ER stress. Log phase cells grown in TAP medium were treated with 5 µg/ml tunicamycin (tun) and samples were

collected and processed for RNA isolation at the indicated times. Expression of the *DAD1* gene was analyzed by qPCR. Values are means of two independent experiments.



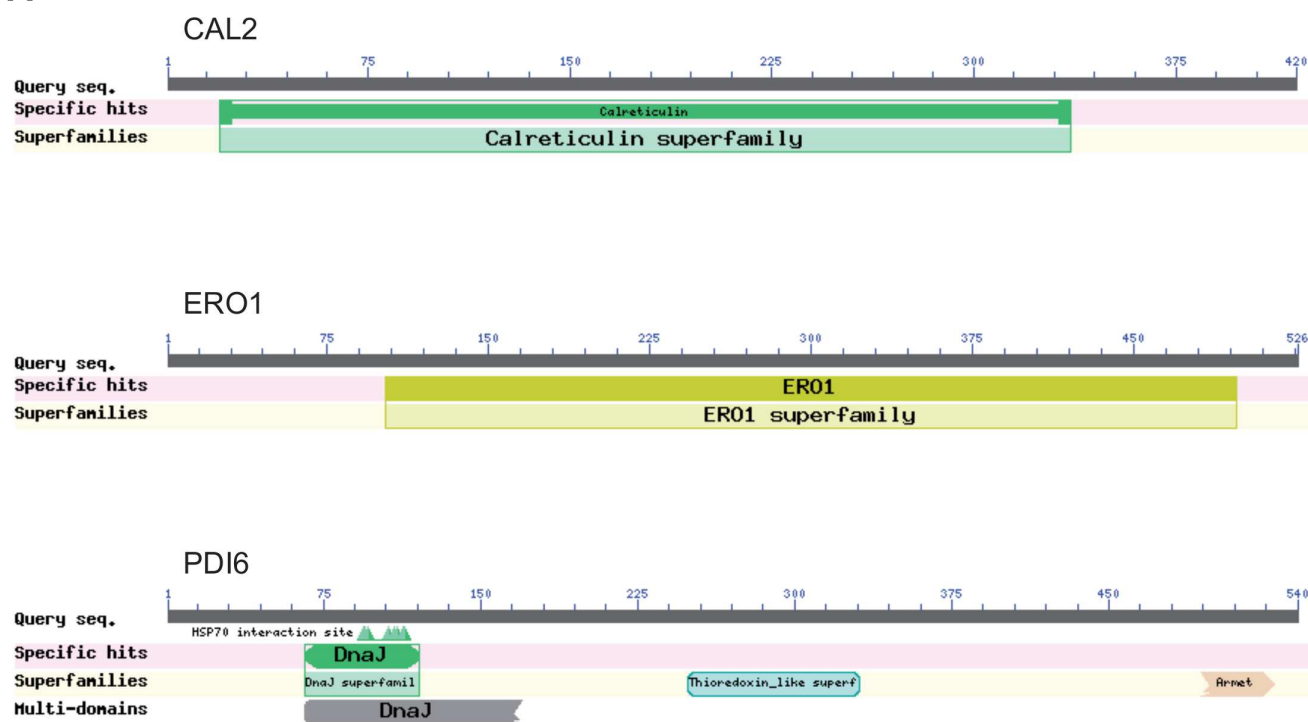
**SFigure 1**





**SFigure 2**

A



SFigure 3

## B

```

CrCAL2      -----MKWGVVAVLATL-----VVAASAKDYFKETFDGS-----WADRWTKSSWKVSDG
AtCAL2      -MAKMIPSLVSLILIGL-----VAIASAAVIFEERFDDG-----WENRWVKSEWKDDN
HsCAL2      -----MLLSVPLLLGLLG-----LAVAEPAVYFKEQFLDGD---GWTSRWIESKHKSD--
CNE1        MKFSAYLWWLFLNLALVKGTSLLSNVTLAEDSFWEHFQAYTNTKHLNQEWITSEAVNNEG
              :   *   :               : .   * * *               ..*   * .

CrCAL2      S---AGEFKLTAGKWYGDAEADKGIQTGPDSKFFAISAPLAT-VFDNTGKDTVVFQFSVKH
AtCAL2      T---AGEWKHTAGNWSGDAN-DKGIQTSEDYRFYAI SAEFP--EFSNKDKTLVFQFSVKH
HsCAL2      ----FGKFVLSSGKFYGDEEKDKGLQTSQDARFYALSASFE--PFSNKQTLVVFQFTVKH
CNE1        SKIYGAWRLSQGRLQGS AW-DKGI AVRTGNAAAMIGHLLETPINVSETDTLVVQYEIKL
              .:: : * . * . ***: . . : . . * .: : *

CrCAL2      EQDLDCGGGYIKVVP--ATSEKQMGFEFGGDTTPYSIMFGPDICG-----YSTRKVHVIL
AtCAL2      EQKLDCCGGYMKLLS--GDVDQKK--FGGDTTPYSIMFGPDICG-----YSTKKVHAIL
HsCAL2      EQNIDCGGGYVKLFP--NSLDQTD--MHGDSEYNIMFGPDICG-----PGTKKVHVIF
CNE1        DNSLTCCGAFIKLMSGFMNVEALKHYAPDTEGVELVFGPDYCAPEINGVQFAINKVDKIT
              ::: ***:::***: : . . : :*** * . . * . *

CrCAL2      TYKGKNYLIKDKDIKAETDQ-LTHVYTLVIKP-DNTYQVLIDLKEVASGSLYEDWD-----
AtCAL2      TYNEANHLLIKKDVPCETDQ-LTHVYTFILRP-DATYSILIDNVEKQTGSLYSDWD-----
HsCAL2      NYGKNVLLINKDIRCKDE-FTHLYTLIVRP-DNTYEVKIDNSQVESGSLDDWD-----
CNE1        HESKRLYLQEMPLSKLTDTSQSHLYTLIIDESAQSFQILIDGKTVMVREHIEDKKVNFEE
              . . * : : * :*:***:: ::: ** . . * .

CrCAL2      --MLPPKTIKDPKASKPEDWDEREEIADPEDKKPEGWDD-----I
AtCAL2      --LLPPKKIKDPSAKKPEDWDEQEYISDPEDKKPDGYDD-----I
HsCAL2      --FLPPKKIKDPDASKPEDWDERAKIDDPDTSKPEDWD-----K
CNE1        PPITPPLMIPDVSVAKPHDWDGRIRIPDPEAVKLSRDERDPLMIPHPDGTEPPEWNSSI
              : ** * * .. **.**: : * * * * .. *

CrCAL2      PATIADKDAKKPEDWDEEDGTWEPPMIPNP-----EYKGEWKAKM
AtCAL2      PKEIPDTSKKPEDWDEEDGEWTAPTIPNP-----EYMGEWKPKQ
HsCAL2      PEHIPDPDAKKPEDWDEEDGEWEPPVIQNP-----EYKGEWKPRQ
CNE1        PEYILDPAQKPSWWKELEHGEWIPPMIKNPLCTAERGCGQQIPGLINNAKYKGPGLNE
              * * * :*:*. *.: . * * . * * * : * * : .

CrCAL2      IKNPAYKGIWVAPDIDNPDYVHDDK-LYNFKDLKFVGFELWQVKSISFDNILLVTDLEA
AtCAL2      IKNPNYKKGWEAPLIDNPDFKDDPE-LYVFPKLKYVGLLEWQVKSISFDNVLICDDPDY
HsCAL2      IDNPDYKGTWIIHPEIDNPEYSPDPS-IYAYDNFGVLGLDLWQVKSITFDNFLTINDEAY
CNE1        IINPNYMGEWHPPEIENPLYEEQHPLRIENVISGVILEFWSGSPNMLISNIYVGKNVTE
              * * * * * * *:***: : : : : :*: . . . :*. : .

CrCAL2      AKKFAEDTWGKHKDEEKAMFDKVKKEEDEKKAKDAPPPPVDAEAAEEDEDEYEDKEEPSG
AtCAL2      AKKLADETWGKLKDAEKAADFDEAEKKNEEESKDAP-AESDAEDEDDEGGDDSDSESK
HsCAL2      AEEFGNETWGVTKAAEKQMKDKQDEEQRLKEEEDK--KRKEEEEAEDKDEDEDKDEDEE
CNE1        AQIIGNKTWLMRDRAFRGSDGPTERKFMNSRLGNLQTTFHNERESPFPFDRIIDRILEQP
              *: :.:.*. . : . .: . . : . . : : * .

CrCAL2      MCSIKIPKEEEES-----GHDEL
AtCAL2      AEETKSDSEETSEKDATAHDEL
HsCAL2      DEEDKEEDEEDVPG--QAKDEL
CNE1        LKFVLTAAVVLLTTSVLCCVFT

```

**SFigure 3**

## C

```

CrER01 MRRLCPSCALAAGACLLALLQHTALAGGAQANLTGISTAAALGAEAAADAFLTNRQLVGGQ
AtER01 -----MGKGA----IKEESEEKKRKTWRWPLATLVVVFLLAVAVSSRTNSNVGFFF
HsER01 -----MGRGWGFLFGLLGAVWLLSSGHGEEQP
ScER01 -----MRLRTAIATLCLTAFTSATSNNS-YIATDQT
          . : * :

CrER01 QEGAATIAADQLTAGESCRLSGHVDECCNCTYQNVDRLN-VALHPLLQQVVRTAFFRYFK
AtER01 SDRNSCSCSLQKTG----KYKGMIEDCC-CDYETVDNLNTEVLNPLQLDLVTTFFRYFK
HsER01 PETAAQRCFCQVSG-----YLD DCT-CDVETIDRFNNYRLFPRQLKLESDFRYFK
ScER01 QNAFNDTHFCVKDR-----NDHVSPSCNVTFNELNAIN-ENIRDDL SALLKSDFFKYFR
          : : :. . : : : * : * . : : : * : : :

CrER01 VNIYCDCLWPD-DSM CALRACSVCECEQSEVPPTWRRLEQGGQGE EEEGSCNSNTCAAEE
AtER01 VKLWCDCLWPD-DGMCRLRDCSVCECPENEFPEPFKKPFVPLPSDD-LKCQE---GK
HsER01 VNLKRPCFWND-ISQCGRDCAVKPCQSDEVDPGIKSASYKYSEAN--NLIECEQAE
ScER01 LDLYKQCSFWDANDGLCLNRACSV DVEDWD TLP EYWQPEILGSFNND--TMKEADSDSD
          : : * : * . * * * : . : . : .

CrER01 LDGKVNSTVDPDTALKLLNLKGWRGFNNPWMAEGEGDE-EYLYVNLLINPERYTG YAGEH
AtER01 PQGAVDRTIDNR-----AFRGWVETKNPWTHDDDTDSGEMSYVNLQLNPERYTG YGPS
HsER01 RLGA VDESLS EETQKAVLQWTKHDDSDNFCEADDIQSPEAEYVDLLNPERYTG YKGPD
ScER01 ECKFLDQLCQTS-----KKPVDIEDTINYCDVNDFNKGNAVLIDL TANPERFTGYGGKQ
          : : . : : : : : : * * : : * : * : *

CrER01 AHR IWRAIYSQSCFHSSSSSDSGSSSEDSSSSSSSGSGPPALSPASLPDPWCPEKRVFYRL
AtER01 ARKIWD SIYSENC PKYSSGE---T-----CPEKKVLYKL
HsER01 AWKIWNVIYEENC FKPKTIKR--PLNP--LASGQGTSEENTFYSWLEGLCVEKRAFYRL
ScER01 AGQIWSTIYQDNCFTIGETG-----ESLAKDAFYRL
          * : * * * : * : * . * : * : *

CrER01 ISGMHASISAHISANYLLSE--ERGLWGHNLTD FRMLGRPE---LRDR IQNLYFAYLF
AtER01 ISGLHSSISMHIAADYLLDE--SRNQWGQNIELMYDRILR-----HPDRVRNMYFTYLF
HsER01 ISGLHASINVHLSARYLLQETWLEKKWGHNITEFQQRF DGI LTEGEGPRRLKNLYFLYLI
ScER01 VSGFHASIGTHLSKEYLNTK---TGKWEFNLDLFMARIGN-----FPDRVTNMYFN YAV
          : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

CrER01 VLR AVTKAAPLLARYDYVTGFGAEEDAATAQLMKSLLTSPELASSCPMPFDEGR LWKGG-
AtER01 VLR AVTKATAYLEQAEYDTGN-HAEDLKTQSLIKQLLYSPKLQTACVPVFDEAKLWQQQ-
HsER01 ELRALSKVL PFFERPDFQLFT--GNKIQDEENKMLLLEILHEIKSFPLHF DENSF FAGDK
ScER01 VAKALWKIQPYLPEFSFCDLVNKEIKNKMDNVISQLDTK-----IFNEDLVFAND-
          : * : * . : . : . : . : . : * : * : . : .

CrER01 -DGLALREELRAAFVNITRIMDCVGCEKCKLWGKQLQTLGVATALKVLFSSSDCNNTLPTS
AtER01 -SGPELKQIQKQFRNISALMDCVGCEKCRLLWGKLQVQGLGTALKILF SVG--NQDIGD-
HsER01 KEAHK LKEDFRLHFRNISRIMDCVGCFKCRLLWGKQLQTLQGLGTALKILFSEK-LIANMPES
ScER01 -LSLTLKDEF RSRFKNVTKIMDCVQCDCRLLWGKIQTTGYATALKILFEINDADEFTKQH
          . * : : : : * * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

CrER01 PALSTLALERNEVIALVNLLERFSASIEYYRQLS-----AELQVAEG-----
AtER01 ---QTLQLQRNEVIALVNLLNRLSESVKMVHDMSPDVERLMEDQIAKVS-----
HsER01 GPSYEFHLTRQEIVSLFNAGRISTSVKKLENFR-----
ScER01 ---IVGKLT KYELIALLQTFGR LSESIESVNMFEKMYGKRLNGSENRLSSFFQNNFFNIL
          * : * : : * : : : * : * : : . :

CrER01 -----AEGAPLPVAVGEPVA-----
AtER01 -----AKPARLRRIWDLAVSFW-----
HsER01 -----N--LLQNIH-----
ScER01 KEAGKSIRYTIENINSTKEGKKKTNNSQSHVFDLKM PKAEIVPRPSNGTVNKWKKAWNT
          : :

CrER01 -----
AtER01 -----
HsER01 -----
ScER01 EVNNVLEAFRFIYRSYLDLPRNIWELSLMKVYKFWNKFIGVADYVSEETREPISYKLDIQ

```

**SFigure 3**

CrPDI6 MGSHPGSHPCSLCCRAHVEDGAAAGVGHAGRRARS<sup>1</sup>LIATVAVVLL<sup>2</sup>LAAQAAPGAEAFRRGGG

VcPDI6 -----MTLRLFLAS<sup>3</sup>IALLGL<sup>4</sup>LLAQHA<sup>5</sup>IAA-----R--G

CvPDI6 -----MGRSCLGRRLGSSLL<sup>6</sup>LLAA<sup>7</sup>AAVA<sup>8</sup>AVR-----

AtATERDJ3A -----MVRTRLAISVVLVST<sup>9</sup>LLLLNV<sup>10</sup>KAK-----

: : \*

CrPDI6 GGGGRD<sup>11</sup>FYS<sup>12</sup>LLG<sup>13</sup>VAK<sup>14</sup>DADEAT<sup>15</sup>IKKAY<sup>16</sup>RRQ<sup>17</sup>ALKW<sup>18</sup>HPDR<sup>19</sup>NTDKKEE<sup>20</sup>AAAR<sup>21</sup>FRD<sup>22</sup>IAAAYE<sup>23</sup>VL<sup>24</sup>S

VcPDI6 ---GRD<sup>25</sup>FYS<sup>26</sup>ILG<sup>27</sup>VAR<sup>28</sup>DAD<sup>29</sup>DAT<sup>30</sup>IKKAY<sup>31</sup>RKQ<sup>32</sup>ALKW<sup>33</sup>HPDR<sup>34</sup>NPNENKEK<sup>35</sup>AEER<sup>36</sup>FRD<sup>37</sup>IAAAYE<sup>38</sup>AL<sup>39</sup>S

CvPDI6 ---DTKY<sup>40</sup>YD<sup>41</sup>HLG<sup>42</sup>VSP<sup>43</sup>DAD<sup>44</sup>ERT<sup>45</sup>IQKAY<sup>46</sup>RR<sup>47</sup>AAL<sup>48</sup>LY<sup>49</sup>HPDR<sup>50</sup>NPD--KPD<sup>51</sup>AEER<sup>52</sup>FR<sup>53</sup>EVAAYE<sup>54</sup>VL<sup>55</sup>S

AtATERDJ3A ---SVDPY<sup>56</sup>KVL<sup>57</sup>GVSK<sup>58</sup>DAK<sup>59</sup>QRE<sup>60</sup>IQKAF<sup>61</sup>HK<sup>62</sup>QSLKY<sup>63</sup>HPDK<sup>64</sup>NKD--KGA<sup>65</sup>QEK<sup>66</sup>FAE<sup>67</sup>INNAYE<sup>68</sup>IL<sup>69</sup>S

. . \* . \*\*\* : \* . : \* : \* : : : \* : \* : : \* : \* : \*

CrPDI6 DADK<sup>70</sup>RRTYD<sup>71</sup>QFGE<sup>72</sup>EGLKHG--GGGG<sup>73</sup>PGG--PGGAGG<sup>74</sup>FNMF<sup>75</sup>QGGD<sup>76</sup>PFEM<sup>77</sup>FNMF<sup>78</sup>FG--GGGG

VcPDI6 DPQ<sup>79</sup>KRRVYD<sup>80</sup>QFGE<sup>81</sup>EGLKGG--DGGG<sup>82</sup>PGGR<sup>83</sup>PGGPG<sup>84</sup>GFQA<sup>85</sup>HFGG<sup>86</sup>DPFEM<sup>87</sup>FNMF<sup>88</sup>FGRGAAGG

CvPDI6 DSEK<sup>89</sup>RQIYDRY<sup>90</sup>GEQGLN<sup>91</sup>QQQGGGG<sup>92</sup>PGG-----NFHF<sup>93</sup>QHGD<sup>94</sup>AFNI<sup>95</sup>FETV<sup>96</sup>FG--

AtATERDJ3A DEEK<sup>97</sup>RKNYD<sup>98</sup>LYGDEK<sup>99</sup>GQPG--FDSG<sup>100</sup>FPGG-----NG--GYSY<sup>101</sup>SSSGG<sup>102</sup>GFNFGG<sup>103</sup>PGG

\* : \* : \* : \* : : . . \* \* \* : \* : . . \*

CrPDI6 GGMGGG<sup>104</sup>MGG<sup>105</sup>QRRRA<sup>106</sup>QFNM<sup>107</sup>GGGG--MGGG<sup>108</sup>FGMG--GGGM<sup>109</sup>GGGRG-----HSGGGGEG

VcPDI6 GGMGGGGGAR--VHF<sup>110</sup>NMG--MGGM<sup>111</sup>GGGM--GGGM<sup>112</sup>GG-----RGGGQP

CvPDI6 -GMGGGGQ<sup>113</sup>RMHFQ<sup>114</sup>FGGGGG--MGGG<sup>115</sup>FGMG<sup>116</sup>GGH<sup>117</sup>GGQH<sup>118</sup>GGGGR-----RHETAG

AtATERDJ3A WQNMGGGG<sup>119</sup>GSKS<sup>120</sup>FS<sup>121</sup>FG<sup>122</sup>GPSESS<sup>123</sup>FG<sup>124</sup>GMDD<sup>125</sup>IFSM<sup>126</sup>SGGS<sup>127</sup>SKKE<sup>128</sup>QFGG<sup>129</sup>FGSS<sup>130</sup>SNAESKS

\* \* \* . \* . \* : \* \* : . \* . \*

CrPDI6 LYDDD<sup>131</sup>PHVQT<sup>132</sup>LT<sup>133</sup>DT<sup>134</sup>TFPAG--DTAW<sup>135</sup>VW<sup>136</sup>LVEFY<sup>137</sup>APW<sup>138</sup>CGH<sup>139</sup>CKQL<sup>140</sup>APKWSA<sup>141</sup>VAK<sup>142</sup>SLK<sup>143</sup>GVV<sup>144</sup>KVG

VcPDI6 MYDSD<sup>145</sup>PYV<sup>146</sup>QQLD<sup>147</sup>GSSL<sup>148</sup>PP--DTNW<sup>149</sup>VW<sup>150</sup>LVEFY<sup>151</sup>APW<sup>152</sup>CGH<sup>153</sup>CKQL<sup>154</sup>APQWSK<sup>155</sup>AAAS<sup>156</sup>LK<sup>157</sup>GVV<sup>158</sup>RVG

CvPDI6 LYDND<sup>159</sup>AFVQ<sup>160</sup>DLTE<sup>161</sup>DT<sup>162</sup>FPEDG--GDGW<sup>163</sup>IW<sup>164</sup>LIEFY<sup>165</sup>APW<sup>166</sup>CGH<sup>167</sup>CRQL<sup>168</sup>APKWRK<sup>169</sup>VAE<sup>170</sup>ALH<sup>171</sup>GVAK<sup>172</sup>VVA

AtATERDJ3A KSS<sup>173</sup>TVAA<sup>174</sup>IKT<sup>175</sup>INS<sup>176</sup>QVYK<sup>177</sup>KDV<sup>178</sup>DQGM<sup>179</sup>TW<sup>180</sup>LLLSY<sup>181</sup>LP<sup>182</sup>SQRGS<sup>183</sup>QYHES<sup>184</sup>IIIEV<sup>185</sup>AE<sup>186</sup>SLQ<sup>187</sup>GALK<sup>188</sup>VVG

. . : : . . \* : \* \* . . . \* : \* : \*

CrPDI6 AIN<sup>189</sup>CEDAKEL<sup>190</sup>CGAH<sup>191</sup>GVRGY<sup>192</sup>PTIQA<sup>193</sup>FVP--GSGAKP-----YSGDRS<sup>194</sup>AKAI<sup>195</sup>SDW<sup>196</sup>ALD<sup>197</sup>LVP

VcPDI6 AVN<sup>198</sup>CDERQQA<sup>199</sup>CQA<sup>200</sup>GLKGY<sup>201</sup>PTIKA<sup>202</sup>FVP--SGGAA<sup>203</sup>PSVRE<sup>204</sup>YNGERS<sup>205</sup>AKAI<sup>206</sup>SDW<sup>207</sup>ALGL<sup>208</sup>VVP

CvPDI6 AVN<sup>209</sup>CEQQQ<sup>210</sup>ALCQE<sup>211</sup>QGV<sup>212</sup>RGYPTI<sup>213</sup>KA<sup>214</sup>F-----SGGHLH-----EYK<sup>215</sup>GDRS<sup>216</sup>ARHL<sup>217</sup>KD<sup>218</sup>WALGL<sup>219</sup>LP

AtATERDJ3A RLNC<sup>220</sup>ETESS<sup>221</sup>LC<sup>222</sup>QGL<sup>223</sup>IVPRRAP<sup>224</sup>RMFV<sup>225</sup>YSYT<sup>226</sup>SSG<sup>227</sup>KAT--LAEY<sup>228</sup>TEELV<sup>229</sup>AKK<sup>230</sup>VK<sup>231</sup>SC<sup>232</sup>QEH<sup>233</sup>LP

: \* : . \* \* : : \* . . \* : \* : \* : \* : \*

CrPDI6 SR-----VSQI<sup>234</sup>T<sup>235</sup>TDLSL<sup>236</sup>R--QLLARC<sup>237</sup>SGSS<sup>238</sup>SSGSS<sup>239</sup>SSSK<sup>240</sup>GK<sup>241</sup>DRAS<sup>242</sup>WSAC<sup>243</sup>VM<sup>244</sup>LVSA

VcPDI6 SR-----VVRI<sup>245</sup>SDEK<sup>246</sup>SLDK<sup>247</sup>LLLA<sup>248</sup>QCSG-----KSKG<sup>249</sup>KDAA<sup>250</sup>AWN<sup>251</sup>VCV<sup>252</sup>LLISN

CvPDI6 KH-----IKTV<sup>253</sup>NKQ<sup>254</sup>QH<sup>255</sup>LA--DFL<sup>256</sup>RQ<sup>257</sup>CTS-----GTGG<sup>258</sup>SSK<sup>259</sup>WGV<sup>260</sup>CALL<sup>261</sup>LLSD

AtATERDJ3A RFSK<sup>262</sup>KIDLNT<sup>263</sup>FDVSA<sup>264</sup>SSQ<sup>265</sup>KTP<sup>266</sup>KVLL<sup>267</sup>LS<sup>268</sup>TKDK<sup>269</sup>TPVI<sup>270</sup>WR--VL<sup>271</sup>SG<sup>272</sup>LYN<sup>273</sup>GRFV<sup>274</sup>YNT<sup>275</sup>EV<sup>276</sup>HD<sup>277</sup>TS

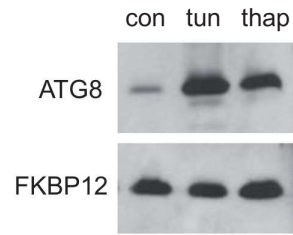
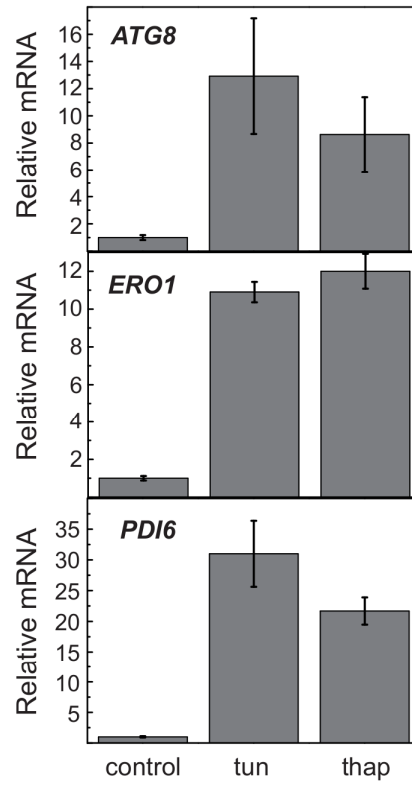
: : : : \* . . : : : : :

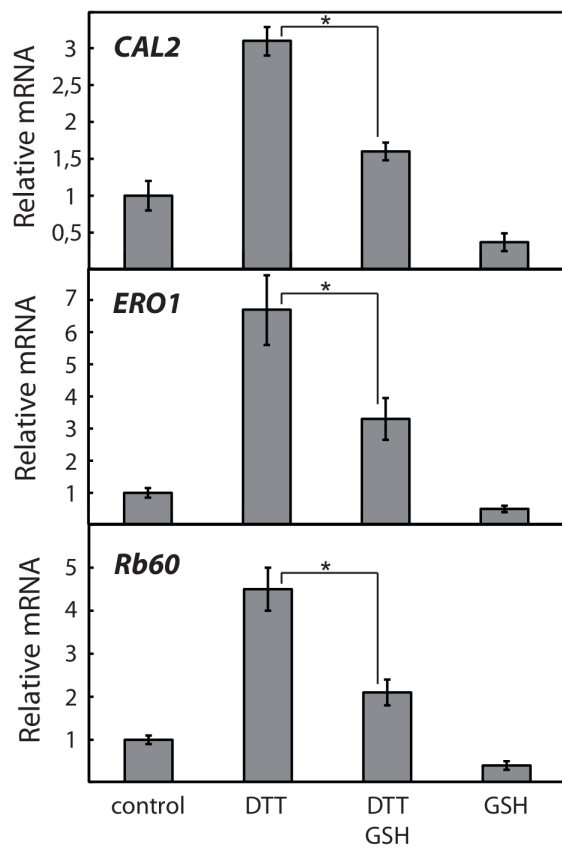
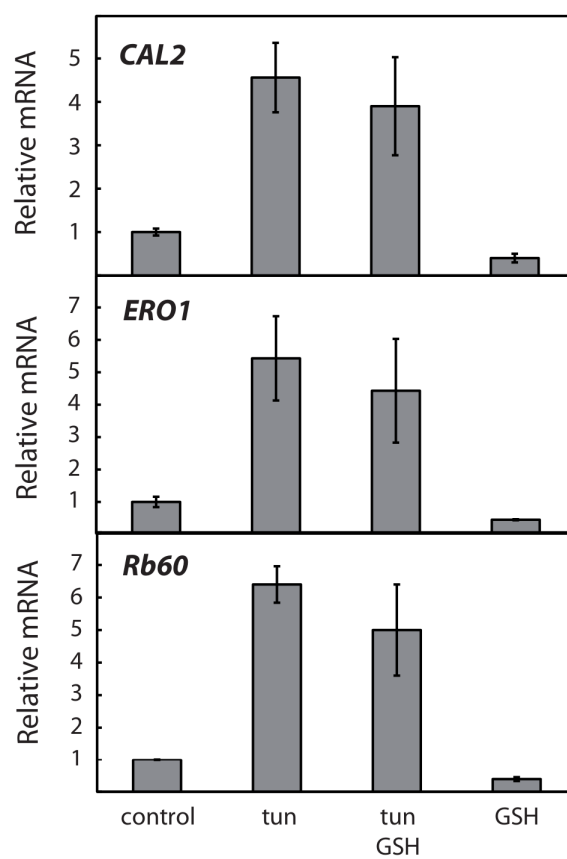
CrPDI6 KSE<sup>278</sup>TPHLL<sup>279</sup>RALS<sup>280</sup>VAYAG<sup>281</sup>KVAF<sup>282</sup>GEL<sup>283</sup>RVGSG<sup>284</sup>KGAG<sup>285</sup>GALS<sup>286</sup>APMA<sup>287</sup>HVAS<sup>288</sup>QLG-----

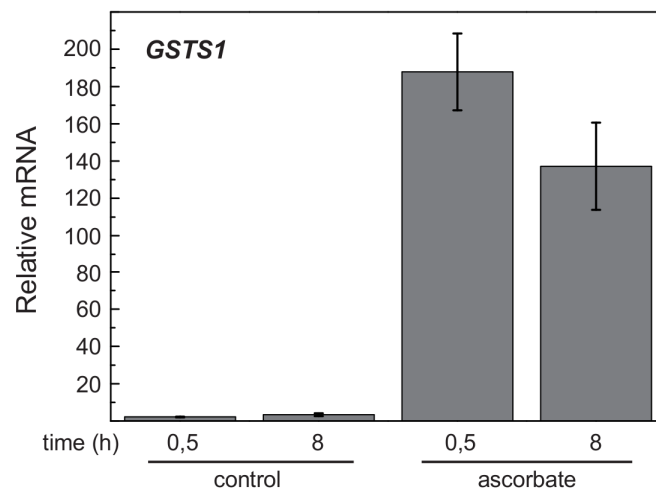
VcPDI6 KSE<sup>289</sup>TPALY<sup>290</sup>RALS<sup>291</sup>VAYGG<sup>292</sup>KVAF<sup>293</sup>GEL<sup>294</sup>NAAASS<sup>295</sup>SGK--AAAA<sup>296</sup>AAV<sup>297</sup>AAK<sup>298</sup>LG-----

CvPDI6 KSE<sup>299</sup>TSALY<sup>300</sup>KSAL<sup>301</sup>RYK<sup>302</sup>GI<sup>303</sup>AFGEA-----LRSNAE<sup>304</sup>ISRE<sup>305</sup>F-----

AtATERDJ3A DP<sup>306</sup>KIQK<sup>307</sup>LG<sup>308</sup>VDK<sup>309</sup>FPA<sup>310</sup>IVG<sup>311</sup>WLSN<sup>312</sup>GKQ<sup>313</sup>VLK<sup>314</sup>TG<sup>315</</sup>

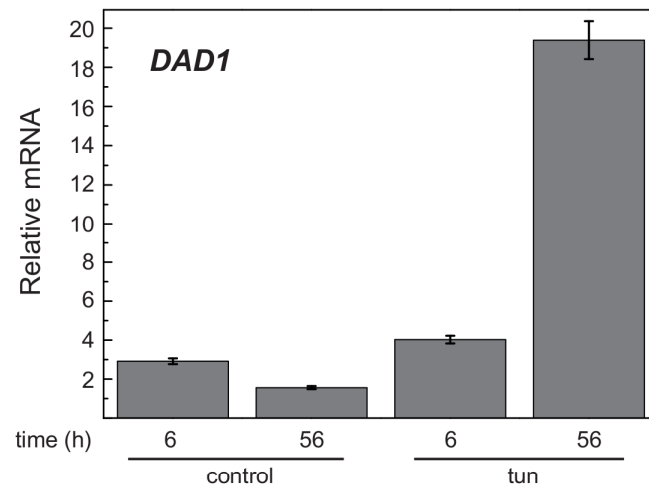
**A****B****SFigure 4**

**A****B****SFigure 5**



**SFigure 6**





**SFigure 7**

#### 4.2 Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*.

##### REFERENCIA COMPLETA:

Pérez-Martín M, Blaby-Haas CE, Pérez-Pérez ME, Andrés-Garrido A, Blaby IK, Merchant SS, Crespo JL. Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* (2015), 14 (9): 964-973.

# Activation of Autophagy by Metals in *Chlamydomonas reinhardtii*

Marta Pérez-Martín,<sup>a</sup> Crysten E. Blaby-Haas,<sup>b</sup> María Esther Pérez-Pérez,<sup>a</sup> Ascensión Andrés-Garrido,<sup>a</sup> Ian K. Blaby,<sup>b</sup> Sabeeha S. Merchant,<sup>b,c</sup> José L. Crespo<sup>a</sup>

Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain<sup>a</sup>; Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, California, USA<sup>b</sup>; Institute for Genomics and Proteomics, University of California, Los Angeles, California, USA<sup>c</sup>

**Autophagy is an intracellular self-degradation pathway by which eukaryotic cells recycle their own material in response to specific stress conditions. Exposure to high concentrations of metals causes cell damage, although the effect of metal stress on autophagy has not been explored in photosynthetic organisms. In this study, we investigated the effect of metal excess on autophagy in the model unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. We show in cells treated with nickel an upregulation of ATG8 that is independent of CRR1, a global regulator of copper signaling in *Chlamydomonas*. A similar effect on ATG8 was observed with copper and cobalt but not with cadmium or mercury ions. Transcriptome sequencing data revealed an increase in the abundance of the protein degradation machinery, including that responsible for autophagy, and a substantial overlap of that increased abundance with the hydrogen peroxide response in cells treated with nickel ions. Thus, our results indicate that metal stress triggers autophagy in *Chlamydomonas* and suggest that excess nickel may cause oxidative damage, which in turn activates degradative pathways, including autophagy, to clear impaired components and recover cellular homeostasis.**

Eukaryotic cells are able to degrade and recycle their own material when they are exposed to nutrient starvation or other adverse conditions through a catabolic pathway known as macroautophagy or autophagy. This process is characterized by the formation of double-membrane vesicles termed autophagosomes that engulf and deliver cytosolic components to the vacuole/lysosome for degradation (1–4). The primary function of autophagy is to recycle cytoplasmic material as well as to clear damaged organelles or toxic cellular components generated during stress in order to maintain cellular homeostasis. In higher eukaryotes, autophagy has also been implicated in cell differentiation, development and cell death, and several human pathologies, such as cancer and neurodegenerative diseases (5, 6).

Autophagy is mediated by highly conserved autophagy-related (ATG) genes, which have been described in organisms ranging from yeasts to mammals. Some ATG proteins are required for the formation of the autophagosome and constitute the core autophagy machinery (4, 7, 8). This group of proteins includes the ATG8 and ATG12 ubiquitin-like systems required for vesicle expansion. The ATG8 protein has been widely used to monitor autophagy in many systems (9) because, unlike other ATG proteins, this protein firmly binds to the autophagosome membrane through a covalent bond to phosphatidylethanolamine (PE). Most of the core ATG proteins are conserved in land plants (10–12) and in evolutionarily distant algae, including freshwater species, such as the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (herein referred to as *Chlamydomonas*) (13) and marine species (14). Our current knowledge about autophagy in algae is still limited compared to our knowledge about autophagy in other eukaryotes, but recent studies, mainly performed in *Chlamydomonas*, have shown that this degradative process is elicited under various stress conditions. Deprivation of nutrients (nitrogen, carbon, or sulfur) or progression into stationary growth phase activates autophagy (15–19). Oxidative stress, photooxidative damage generated by carotenoid deficiency, high light stress, cold stress, or the accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) also triggers autophagy in *Chlamydomonas* (19–22). Moreover, a loss of chloroplast integrity due to depletion

of the chloroplastic ClpP protease has been shown to activate autophagy in this alga (23). Recent studies have also linked this catabolic process with the degradation of lipid droplets in the green alga *Auxenochlorella protothecoides* (24) or with the propagation of DNA viruses in the marine alga *Emiliania huxleyi* (25). In land plants, the availability of mutant lines defective in key ATG genes has contributed to the identification of cellular processes mediated by autophagy. Functional studies have revealed that autophagy is required for the proper response of plant cells to abiotic stresses, senescence, and pathogen infection (for recent reviews, see references 1, 2, and 26).

The signaling mechanisms that regulate autophagy in plants and algae are still poorly understood, but mounting evidence indicates that reactive oxygen species (ROS) generated during specific stresses may be involved in the activation of autophagy. Supporting this hypothesis, it has been shown that treatment of *Arabidopsis* plants or *Chlamydomonas* cells with the ROS inducer hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or methyl viologen results in severe oxidative stress and leads to autophagy induction (19, 21, 27). Moreover, carotenoid depletion in *Chlamydomonas* causes ROS accumulation, which in turn triggers autophagy (21). Metal toxicity has been associated with ROS production and oxidative stress signaling in plants and algae (28–32), but it remains unknown whether the cellular response to metals in these organisms may include the activation of autophagy. *Chlamydomonas* has been

Received 3 May 2015 Accepted 5 July 2015

Accepted manuscript posted online 10 July 2015

Citation Pérez-Martín M, Blaby-Haas CE, Pérez-Pérez ME, Andrés-Garrido A, Blaby IK, Merchant SS, Crespo JL. 2015. Activation of autophagy by metals in *Chlamydomonas reinhardtii*. Eukaryot Cell 14:964–973. doi:10.1128/EC.00081-15.

Address correspondence to José L. Crespo, crespo@ibvf.csic.es.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00081-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/EC.00081-15

widely used to investigate metal metabolism and the cellular response to metal excess and metal-limiting conditions (28, 33, 34), and the development of genome-wide technologies has increased our current understanding about metal signaling in this alga. In this study, we show that high concentrations of nickel, cobalt, or copper trigger autophagy in *Chlamydomonas*.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains and growth conditions.** *Chlamydomonas reinhardtii* cw15 4B+, a cell wall-deficient strain, was obtained from the laboratory of Jean-David Rochaix. The *cr1-1* mutant strain (strain CC-3959) has been previously described (35). *Chlamydomonas* cells were grown under continuous illumination at 25°C in Tris-acetate phosphate (TAP) medium as described previously (36). All treatments were performed in liquid cultures in exponential growth phase ( $10^6$  cells/ml).

**Generation of the SATG8 *Chlamydomonas* strain.** To obtain a *Chlamydomonas* strain expressing nickel-induced ATG8, cw15 cells were transformed by electroporation (37) with the pMPM1 plasmid harboring the cDNA of the *Chlamydomonas* ATG8 gene under the control of the CYC6 promoter ( $P_{CYC6}$ ). To generate the pMPM1 plasmid, an 857-bp DNA fragment containing the promoter of the CYC6 gene from *Chlamydomonas* (38) was amplified by PCR using primers 5'-CCGGCTCGAGG CCTGGACAAGGCACTTACGTAAC-3' and 5'-CCGGCATATGGGA GTAGGTTGAGTTAGTTCTGTG-3', digested with flanking XhoI and NdeI restriction enzymes, and cloned into the pSL18 plasmid (S. Lemaire and J. D. Rochaix, unpublished data) at the XhoI and NdeI restriction sites. Next, a synthetic cDNA of the *Chlamydomonas* ATG8 gene with an N-terminal Strep tag (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) (39) was cloned into pSL18 containing the CYC6 promoter at the SpeI restriction site.

**Protein preparation and immunoblot analysis.** *Chlamydomonas* cells from liquid cultures were collected by centrifugation ( $4,000 \times g$ , 5 min), washed once in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer, and resuspended in a minimal volume of the same solution. Cells were lysed by two cycles of slow freezing to  $-80^\circ\text{C}$ , followed by thawing at room temperature. The soluble cell extract was separated from the insoluble fraction by centrifugation ( $15,000 \times g$ , 15 min) in a microcentrifuge at  $4^\circ\text{C}$ . For immunoblot analyses, total protein extracts (30  $\mu\text{g}$ ) were subjected to 15% SDS-PAGE and then transferred to nitrocellulose membranes (catalog no. HATF00010; Millipore). Anti-*Chlamydomonas* ATG8 (anti-CrATG8) (19) and secondary antibodies were diluted 1:2,500 and 1:10,000, respectively, in phosphate-buffered saline containing 0.1% (wt/vol) Tween 20 (catalog no. A4974; AppliChem) and 5% (wt/vol) milk powder. A Lumina Crescendo immunoblotting detection system (catalog no. WBLUR0500; Millipore) was used to detect the proteins with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit immunoglobulin secondary antibodies (catalog no. A6154; Sigma-Aldrich).

**Fluorescence microscopy.** *Chlamydomonas* cells were fixed and stained for immunofluorescence microscopy as previously described (19). Affinity-purified polyclonal anti-ATG8 was used as the primary antibody at a 1:500 dilution. For signal detection, a fluorescein isothiocyanate-labeled goat anti-rabbit immunoglobulin antibody (1:500; catalog no. F4890; Sigma-Aldrich) was used. Preparations were photographed on a DM6000B microscope (Leica) with an ORCA-ER camera (Hamamatsu) and processed with Leica Application Suite advanced fluorescence software.

**RNA isolation and quantification.** *Chlamydomonas* total RNA was isolated from frozen cell pellets as previously described (40). First-strand cDNA was produced using 2  $\mu\text{g}$  total RNA, an oligo(dT) primer, and 100 units of SuperScript II RNase H-reverse transcriptase (catalog no. 18064-014; Invitrogen) in a 50- $\mu\text{l}$  reaction mixture. Quantitative real-time reverse transcription-PCR was performed on an iCycler apparatus (Bio-Rad). The PCR mixtures, in a final volume of 20  $\mu\text{l}$ , contained 10  $\mu\text{l}$  of FastStart Universal SYBR green master mix (catalog no. 04913850001; Roche), 1  $\mu\text{l}$  of cDNA dilution, 250 nM each primer, and distilled water.

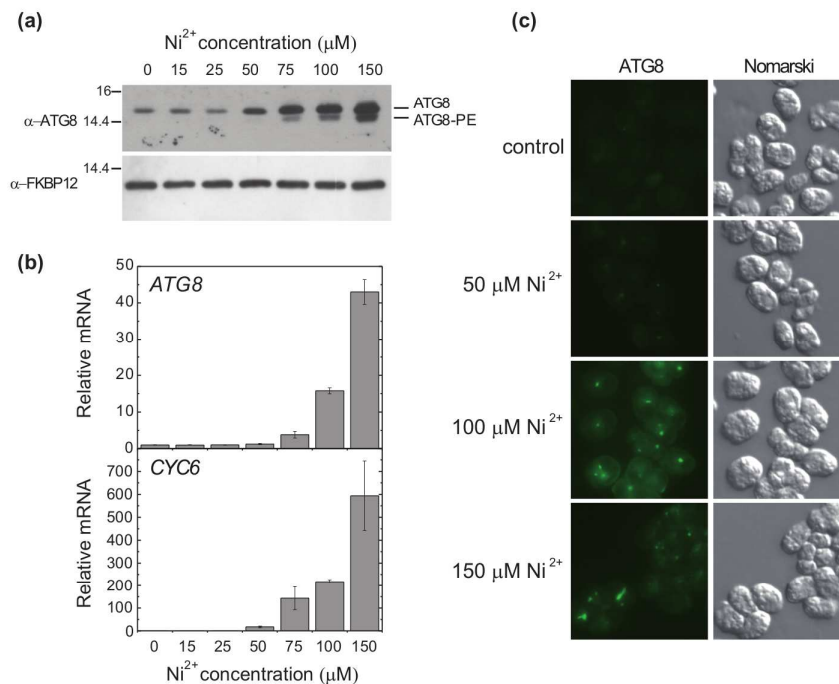
All reactions were performed in triplicate with 2 to 4 biological replicates. *CBLP* was used as a constitutively expressed gene (41). The primer pairs used for quantitative PCR (qPCR) were 5'-CTTCTCGCCCATGACCA C-3' and 5'-CCCACCAAGTTGTTCTTCAG-3' for *CBLP*, 5'-TCCCCG ATATCGACAAGAAG-3' and 5'-TGCGGATGACGTACACAAAT-3' for *ATG8*, 5'-CGCAGTTCGAAAAGGGTGCA-3' and 5'-ATGACTGGAAT TCGGTCTGG-3' for *Strep-ATG8*, 5'-GCTTCAAGGTGGAGAGCAT C-3' and 5'-TAGTACTTCCAGGCGGCATC-3' for *CYC6*, 5'-GCGGTC GCCAATAACCAAT-3' and 5'-AAGGGCTGTCCCGAAAGC-3' for *GPXH/GPX5* (42), 5'-CAGAGGTGAAAGGCGGATAC-3' and 5'-GTGT TGCAATGGACTTCAGC-3' for *GSTS1* (43), 5'-TGTCACCTGCTCAT CAACC-3' and 5'-CTGCTGCTGCTACTGCTGTC-3' for *ERO1*, and 5'-GGTGTGGCTGGTTGAGTTCT-3' and 5'-CTCTTTGGCGTCTCACA GT-3' for *PDI6*.

**Transcriptome analysis.** To identify transcripts whose abundance was affected by the addition of  $\text{Ni}^{2+}$  independently of CRR1, we reanalyzed transcriptome sequencing (RNA-Seq) data previously collected to identify CRR1-dependent  $\text{Ni}^{2+}$ -induced transcripts (C. E. Blaby-Haas et al., unpublished data). Our analysis included all transcripts from strains CC-5071 (*cr1-2:CRR1* mt<sup>+</sup> [referred to as the CRR1 strain]) and CC-5073 (*cr1-2:CRR1- $\Delta$ Cys* mt<sup>+</sup> [referred to as the CRR1- $\Delta$ Cys strain]) whose abundance was considered to be significantly differentially abundant by the Cuffdiff algorithm (44) ( $q$  value,  $<0.05$ ) between growth in the absence and growth in the presence of 50  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  and whose abundance was greater than or equal to 10 fragments per kilobase per million (FPKM). From this data set we generated the final list of CRR1-independent  $\text{Ni}^{2+}$ -induced transcripts by identifying those transcripts not considered to be significantly differentially abundant by the Cuffdiff algorithm ( $q$  value,  $>0.05$ ) between the CRR1- $\Delta$ Cys and CRR1 strains in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$ . For comparison of this list of transcripts to  $\text{H}_2\text{O}_2$ -responsive transcripts, the RNA-Seq reads presented previously (45) were realigned using the v5 genome assembly and v5.5 gene models as a reference. The set of transcripts whose abundance was considered to be significantly differentially abundant (as described above) between 1 h after addition of 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and immediately prior to addition was generated. For comparisons of transcripts with increased abundance in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  in the CRR1 strain and increased abundance in previously published RNA-Seq experiments, before determining the overlap we applied the cutoffs of  $\geq 10$  FPKM/reads per kilobase per million and a  $\geq 2.0$ -fold change in expression between mock-treated cultures and cultures to which rose bengal was added (46), 0 h and either 12 h, 31 h, 43 h, or 48 h of ClpP1 depletion (23), 0 h and either 2 h or 8 h after rapamycin addition (23), 0 h and 6 h after transfer to dark anoxic conditions (47), conditions with 20  $\mu\text{M}$  Fe supplementation and conditions with either 1  $\mu\text{M}$  or 0.25  $\mu\text{M}$  Fe supplementation (48), the presence and absence of Cu (49), and the presence and absence of Zn (50). The list of upregulated transcripts (that met these cutoffs) from each data set was then compared to the list of transcripts that increased in abundance (using the same cutoffs) in the CRR1 strain after  $\text{Ni}^{2+}$  addition. The  $P$  value for each overlap was calculated using R with the command `sum(dhyper((q:m, k, 17301-k, m)))`, where  $q$  is the number of transcripts in the overlap,  $m$  is the number of transcripts that increased in abundance in the data set being compared, and  $k$  is the number of transcripts that increased in abundance following  $\text{Ni}^{2+}$  addition. Because most of the data sets that we performed these comparisons with were aligned to the v4 assembly of the *Chlamydomonas* genome, we converted locus identifiers in the  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  data sets from v5 to v4 (which contains 17,301 loci, the total population in the equation) and the Cu deficiency data set from v3 to v4 using the correspondence table available at <http://genome.jgi.doe.gov/pages/dynamicOrganismDownload.jsf?organism=PhytozomeV10>.

## RESULTS

**Nickel ions trigger autophagy in *Chlamydomonas*.** The toxic effect of transition metals, such as nickel, copper, cobalt, or cadmium, in algae is well documented (29, 51–55), but the molecular



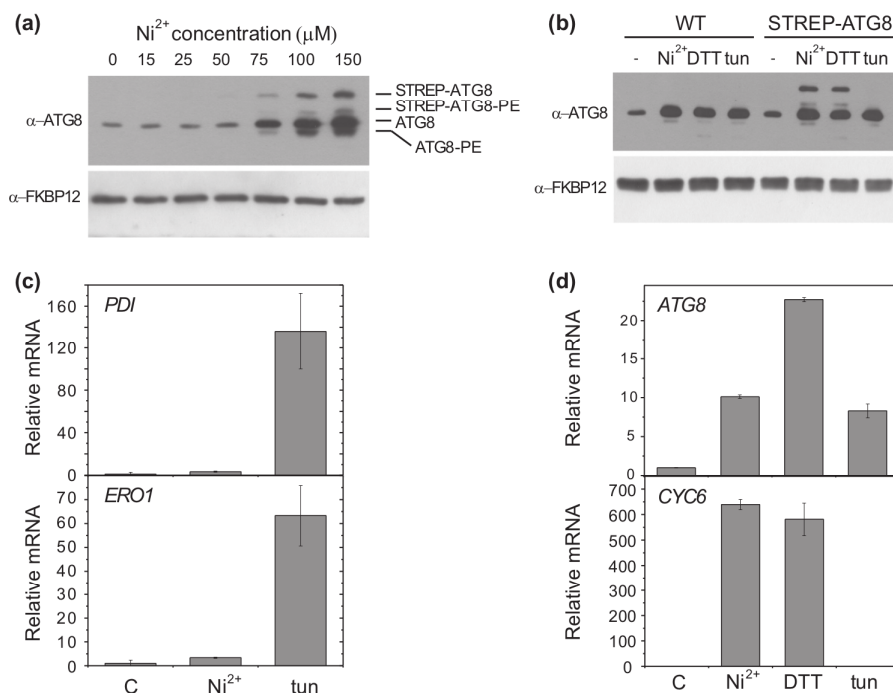


**FIG 1** Exposure to high concentrations of nickel triggers autophagy in *Chlamydomonas*. (a) Immunoblot demonstrating the accumulation and lipidation of ATG8 in *Chlamydomonas* cells grown to log phase ( $10^6$  cells/ml) in TAP medium and treated with the indicated concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$  for 8 h. Immunoblot analysis with an anti-FKBP12 antibody was used as a loading control. Molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left. (b) Analysis of *ATG8* and *CYC6* gene expression by qPCR in *Chlamydomonas* cells treated as indicated in the legend to panel a. mRNA levels were compared and normalized to those for untreated cells (for which the level of mRNA expression was given a value of 1). The data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. (c) Immunolocalization of ATG8 in *Chlamydomonas* cells grown to log phase in TAP medium and treated with 50, 100, or 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  for 8 h. Control refers to untreated cells.

processes that mediate the cellular response to these metals are still poorly understood. In this study, we investigated the effect of nickel and other transition metals on autophagy in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Toward this goal, *Chlamydomonas* cells were treated for 8 h with different concentrations of nickel (0, 15, 25, 50, 75, 100, 150  $\mu\text{M}$ ) and autophagy was monitored by analyzing the protein abundance and lipidation of ATG8. Our results revealed an increase in ATG8 abundance and the detection of higher levels of lipidated forms in cells treated with 100 and 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  than in cells treated with 75  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  (Fig. 1a). We also analyzed the transcript abundance of the *ATG8* gene by qPCR since it has been shown that enhanced transcription of this gene correlates with the activation of autophagy in *Chlamydomonas* (20). In close agreement with the ATG8 protein abundance, expression of *ATG8* was progressively upregulated when cells were treated with 75, 100, or 150  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  (Fig. 1b). The levels of mRNA for the *CYC6* gene, whose expression is tightly regulated by  $\text{Ni}^{2+}$  (53), were also determined as a positive control for  $\text{Ni}^{2+}$  treatment. As expected, expression of *CYC6* was strongly induced at  $\text{Ni}^{2+}$  concentrations above 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 1b). To further characterize a possible effect of nickel on autophagy, we analyzed the cellular distribution of ATG8 by immunofluorescence since in previous studies we showed that autophagy activation has a strong effect on the localization of ATG8 in *Chlamydomonas* (19). In consonance with the findings of immunoblotting and qPCR analysis, treatment of *Chlamydomonas* cells with 50  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  had only a moderate effect on ATG8 localization compared to that found in untreated cells, although a single spot could be observed in most

cells (Fig. 1c). Higher concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$  resulted in a pronounced increase in the ATG8 signal and the detection of several spots per cell (Fig. 1c). A similar punctate pattern has been observed for ATG8 in *Chlamydomonas* cells subjected to different autophagy-activating conditions (19–21). Taken together these results indicate that the presence of high concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$  ions in the medium triggers autophagy in *Chlamydomonas*. To our knowledge, this is the first experimental evidence showing the activation of autophagy by high concentrations of metal in a photosynthetic organism.

**Nickel and tunicamycin-induced ER stress activate autophagy through different mechanisms.** The finding that high concentrations of nickel activate autophagy prompted us to compare this effect with the effects of other stresses that also upregulate this catalytic process in *Chlamydomonas*, such as ER stress (19, 20). To achieve this aim, we have generated a *Chlamydomonas* strain (termed SATG8) that expresses a Strep-tagged form of ATG8 under the control of the *CYC6* promoter ( $P_{\text{CYC6}}$ ), in addition to the endogenous ATG8 protein. The *CYC6* promoter has been widely used as an inducible gene expression system in *Chlamydomonas* (56–59) because it is repressed by copper and induced by nickel (53, 60). Therefore, in the absence of nickel, SATG8 cells express only endogenous ATG8, whereas addition of this metal to the medium resulted in the detection of both endogenous and  $P_{\text{CYC6}}$ -driven ATG8 in an  $\text{Ni}^{2+}$  concentration-dependent manner (Fig. 2a). Expression of  $P_{\text{CYC6}}$ -driven ATG8 in SATG8 cells was confirmed by qPCR (see Fig. S1 in the supplemental material). The two different ATG8 proteins could be easily and unambigu-



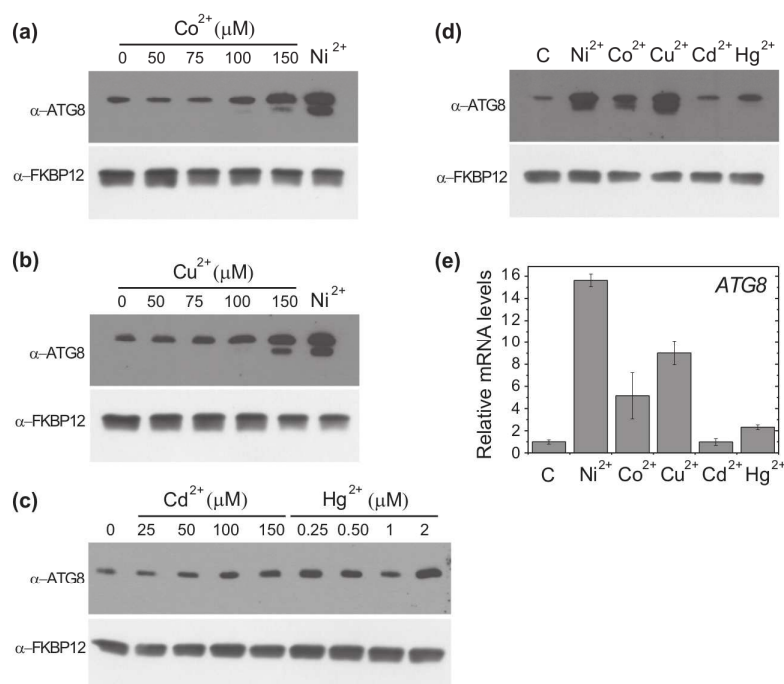
**FIG 2** Nickel- and tunicamycin-induced ER stress induces autophagy through different mechanisms. (a) Immunoblot showing the accumulation and lipidation of endogenous and Strep-tagged ATG8 in SATG8 cells grown to log phase in TAP medium and treated with the indicated concentrations of  $\text{Ni}^{2+}$  for 8 h. Immunoblot analysis with an anti-FKBP12 antibody was used as a loading control. (b) Immunoblot analysis of endogenous and Strep-tagged ATG8 in *wt15* and SATG8 cells grown to log phase in TAP and treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ , 2.5 mM DTT, or 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tunicamycin (tun) for 8 h. (c) Analysis by qPCR of *ERO1* and *PDI6* gene expression in *wt15* cells treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  or 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tunicamycin for 8 h. C, untreated control cells. mRNA levels were compared and normalized to those for control cells (for which the level of mRNA expression was given a value of 1). The data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments. (d) Analysis by qPCR of *ATG8* and *CYC6* gene expression in *wt15* cells treated as indicated in the legend to panel b.

ously detected by immunoblotting with an anti-ATG8 antibody due to the different sizes of the tagged and native proteins (Fig. 2a). *wt15* and SATG8 cells were treated with  $\text{Ni}^{2+}$  or tunicamycin, an inducer of ER stress and autophagy in *Chlamydomonas* (19, 20), and the abundance of the ATG8 protein was analyzed by immunoblotting. As expected, both treatments increased the abundance of ATG8 in *wt15* cells (Fig. 2b). In SATG8 cells, a similar effect on endogenous ATG8 was observed with  $\text{Ni}^{2+}$  and tunicamycin treatment, yet only  $\text{Ni}^{2+}$  treatment and not tunicamycin treatment induced the expression of  $P_{\text{CYC6}}$ -driven ATG8 (Fig. 2b). These results indicate that despite the ability of  $\text{Ni}^{2+}$  and tunicamycin to activate autophagy in *Chlamydomonas*, these two stressors likely operate through different mechanisms. Accordingly, we observed that  $\text{Ni}^{2+}$  had no effect on the abundance of mRNAs for *ERO1* and *PDI6* (Fig. 2c), which are upregulated in ER-stressed cells (20), suggesting that this metal does not induce autophagy via ER stress activation.

In the course of these studies, we tested the response to dithiothreitol (DTT), another inducer of ER stress that is often used interchangeably with tunicamycin. Interestingly, we observed that DTT increased the abundance of endogenous and  $P_{\text{CYC6}}$ -driven ATG8 (Fig. 2b), indicating that DTT is able to activate the expression of the  $\text{Ni}^{2+}$ -responsive gene *CYC6* in *Chlamydomonas*. To confirm the effect of DTT on the *CYC6* promoter, we determined the transcript abundance of this gene by qPCR in *wt15* cells treated with  $\text{Ni}^{2+}$ , DTT, or tunicamycin. We found that, indeed,  $\text{Ni}^{2+}$  or

DTT strongly increased the level of accumulation of *CYC6* transcripts, whereas no induction was observed with tunicamycin (Fig. 2d). The effect of  $\text{Ni}^{2+}$ , DTT, or tunicamycin in these cells was confirmed by the upregulation of the *ATG8* mRNA level (Fig. 2d). The finding that DTT was able to induce the expression of *CYC6* strongly suggests that this reducing agent acts on other cellular compartments, in addition to the ER, and may therefore cause damage in the cell other than ER stress.

**Copper and cobalt but not cadmium or mercury activates autophagy in *Chlamydomonas*.** In addition to nickel, the effects of other metals, including copper, cobalt, cadmium, and mercury, on autophagy were investigated. We analyzed the ATG8 abundance in *Chlamydomonas* cells treated with different concentrations of  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CdCl}_2$ , or  $\text{HgCl}_2$ . Our results revealed that both  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  induce the accumulation and lipidation of ATG8 to a level similar to the one observed in cells treated with  $\text{Ni}^{2+}$  (Fig. 3a and b). Immunofluorescence assays confirmed that the activation of ATG8 in cells treated with  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  was like that in cells treated with  $\text{Ni}^{2+}$  (see Fig. S2 in the supplemental material). These results indicate that the presence of high concentrations of  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  in the medium triggers autophagy in *Chlamydomonas*. In contrast to the effects of treatment with  $\text{Co}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ , treatment of *Chlamydomonas* cells with  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Hg}^{2+}$  had no significant effect on ATG8 protein abundance (Fig. 3c and d) or the cellular distribution (see Fig. S2 in the supplemental material). Consonant with these data, *ATG8* mRNA abundance



**FIG 3** Cobalt and copper but not cadmium or mercury induces autophagy in *Chlamydomonas*. (a to c) Immunoblots showing the effect of  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ , and  $\text{Hg}^{2+}$  on ATG8 abundance and lipidation. *cw15* cells grown to log phase in TAP medium were treated with the indicated concentrations of metals for 8 h. Immunoblot analysis with an anti-FKBP12 antibody was used as a loading control. (d) Immunoblot analysis of ATG8 from *cw15* cells treated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ , 150  $\mu\text{M}$   $\text{Co}^{2+}$ , 150  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ , 150  $\mu\text{M}$   $\text{Cd}^{2+}$ , or 2  $\mu\text{M}$   $\text{Hg}^{2+}$  for 8 h. (e) Analysis by qPCR of *ATG8* expression from cells treated as indicated in the legend to panel d. mRNA levels were compared and normalized to those for control cells (for which the level of mRNA expression was given a value of 1). The data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments.

was upregulated by  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$  but not by  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Hg}^{2+}$  (Fig. 3e). Together these results indicate that the presence of high concentrations of  $\text{Cd}^{2+}$  or  $\text{Hg}^{2+}$  in the medium does not result in autophagy activation in *Chlamydomonas* like the presence of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , or  $\text{Cu}^{2+}$  does.

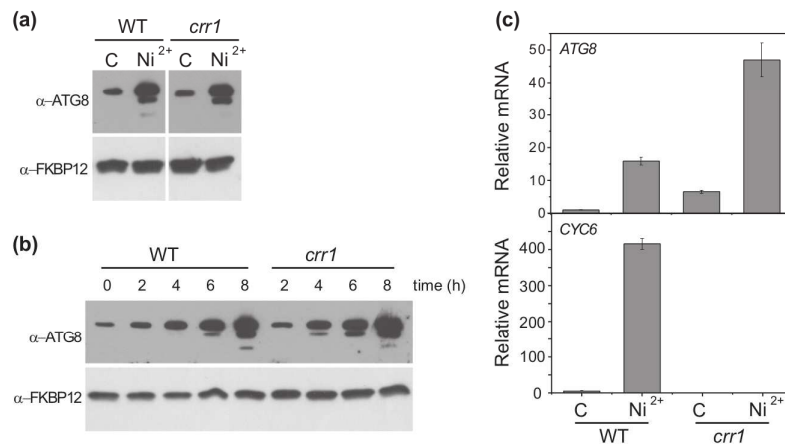
**Induction of autophagy by nickel is independent of CRR1.** The transcription factor CRR1 is required for the  $\text{Ni}^{2+}$ -responsive expression of *CYC6* and the Cu-responsive expression of many additional genes in *Chlamydomonas* (35, 53). Since our results indicated that nickel activates the expression of the *ATG8* gene in *Chlamydomonas*, we investigated whether CRR1 may participate in the upregulation of autophagy mediated by this metal. We analyzed ATG8 in wild-type and *crr1* mutant cells treated with  $\text{Ni}^{2+}$ , and a similar accumulation of this protein was detected in both strains (Fig. 4a). However, the increase in ATG8 abundance appeared to take place slightly earlier in the *crr1* mutant (Fig. 4b), possibly due to a higher sensitivity of this mutant to  $\text{Ni}^{2+}$ . In agreement with the immunoblotting data, we observed that *ATG8* transcript accumulation was upregulated by  $\text{Ni}^{2+}$  in *crr1* mutant cells (Fig. 4c). As previously reported (53), *CYC6* expression was abolished in the *crr1* mutant (Fig. 4c). Analysis of *ATG8* expression also revealed that the basal level of mRNA for this gene is higher in the *crr1* mutant cells than wild-type cells, even though no significant difference in ATG8 abundance in untreated cells was observed (Fig. 4a), suggesting that the posttranscriptional regulation of *ATG8* prevents the accumulation of this protein under conditions that do not require an active autophagy pathway. From

these results, we concluded that there must be a CRR1-independent pathway that signals to autophagy in response to nickel toxicity.

**RNA-Seq analysis of nickel-treated cells reveals an increase in the abundance of the protein degradation machinery and a substantial overlap with the  $\text{H}_2\text{O}_2$  response.** To understand the global effect of  $\text{Ni}^{2+}$  on autophagy, we undertook a genome-wide transcriptome analysis of *Chlamydomonas* cells treated with this metal. In these experiments, cells were treated with 50  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  for 6 h with the objective of identifying the primary responses to a high concentration of  $\text{Ni}^{2+}$ . As mentioned above,  $\text{Ni}^{2+}$  induces the expression of several copper deficiency response genes in a CRR1-dependent manner (35, 53), although this transcription factor is dispensable for  $\text{Ni}^{2+}$ -induced autophagy. Therefore, we sought to identify those transcripts whose change in abundance is specific to  $\text{Ni}^{2+}$  addition versus those transcripts whose change in abundance is due to direct and indirect consequences of an  $\text{Ni}^{2+}$ -CRR1 interaction. To accomplish this goal, we determined the genome-wide response of *Chlamydomonas* to the addition of  $\text{Ni}^{2+}$  in the *crr1* mutant with either wild-type *CRR1* (strain CRR1) or a mutant version of *CRR1* (strain CRR1- $\Delta\text{Cys}$ ) added back. In the CRR1- $\Delta\text{Cys}$  strain, the protein carries a deletion in the cysteine-rich domain near the C terminus of CRR1. This mutation abolishes the ability of  $\text{Ni}^{2+}$  to induce *CYC6* expression, but the strain CRR1-mediated Cu response is preserved (35).

We found 336 genes whose transcripts were upregulated in both the CRR1 and CRR1- $\Delta\text{Cys}$  strains (overlap between A and B





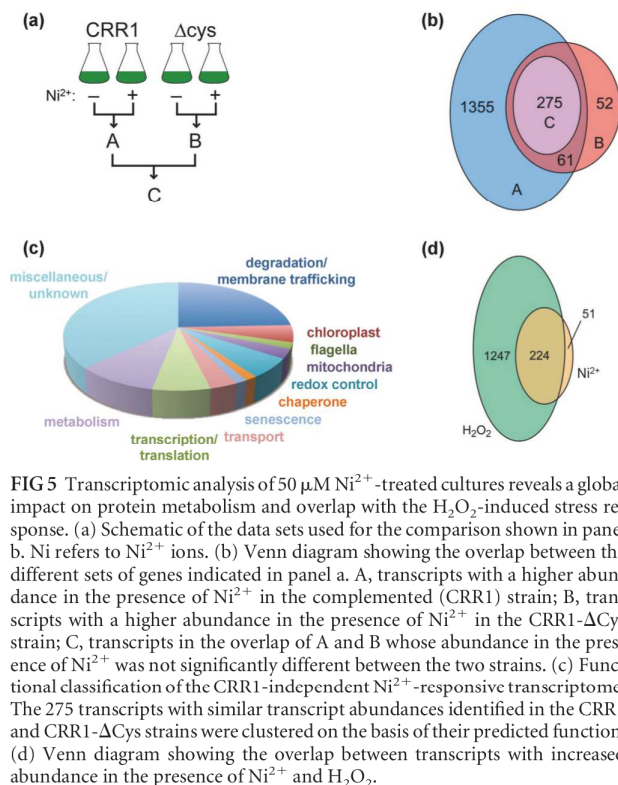
**FIG 4** Activation of autophagy by nickel is independent of CRR1. (a) Immunoblots showing the accumulation and lipidation of ATG8 in *cw15* cells compared to those in *crr1* cells grown to log phase in TAP medium and treated with  $100 \mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$  for 8 h. WT, wild type; C, untreated control cells. Immunoblot analysis with an anti-FKBP12 antibody was used as loading control. (b and c) Analysis by qPCR of *ATG8* and *CYC6* gene expression in *cw15* and *crr1* cells treated as explained in the legend to panel a. mRNA levels were compared and normalized to those for control cells (for which the level of mRNA expression was given a value of 1). The data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments.

in Fig. 5a and b). Of these genes, the mRNA abundance of 275 transcripts was not significantly different between the two strains (comparison C in Fig. 5a and b). We consider this core set of 275 genes to be the CRR1-independent  $\text{Ni}^{2+}$ -responsive transcriptome. Among this core set there is a substantial enrichment of the protein degradation machinery, including the autophagy genes *ATG3* and *ATG8*, genes for proteasome subunits and several

classes of proteases, and genes involved in ubiquitin-dependent degradation of ER-associated protein degradation substrates, such as Cdc48, Ufd1, or Otu1 homologs (see Table S1 in the supplemental material). This subset of genes related to degradative pathways accounts for 25% of the upregulated transcripts (Fig. 5c; see also Table S1 in the supplemental material).

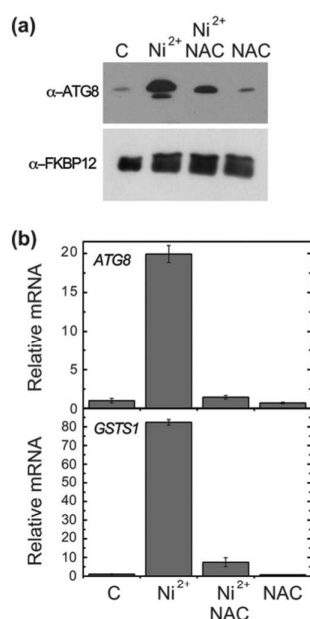
Remarkably, we found a substantial enrichment of genes whose transcripts were also upregulated by the presence of exogenous  $\text{H}_2\text{O}_2$  (45) (Fig. 5d): 80% of the 275 nickel-responsive genes were also upregulated by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (the overlap has a *P* value of  $1.5\text{e}-227$  on the basis of the hypergeometric distribution). Cellular damage caused by  $\text{Ni}^{2+}$  or  $\text{H}_2\text{O}_2$  may lead to the activation of common cellular processes in *Chlamydomonas*, including autophagy. Indeed, the transcript abundance of some of the most highly  $\text{H}_2\text{O}_2$ -responsive genes is similarly affected by  $\text{Ni}^{2+}$  addition (see Fig. S3 in the supplemental material); the response of two sentinel oxidative stress-related genes, *GST1* and *GPXH* (43, 61, 62), was confirmed by qPCR (see Fig. S3 in the supplemental material). To further investigate a role of oxidative damage in  $\text{Ni}^{2+}$ -induced autophagy, ATG8 protein abundance and lipidation were examined in cells treated with  $\text{Ni}^{2+}$  in the presence of the antioxidant *N*-acetyl cysteine (NAC). The effect of  $\text{Ni}^{2+}$  on ATG8 was largely reduced in cells grown in NAC-containing medium (Fig. 6a). Moreover, the levels of mRNA for the *ATG8* and *GST1* genes remained low when cells were treated with  $\text{Ni}^{2+}$  in the presence of NAC (Fig. 6b). Taken together our results strongly suggest that treatment of *Chlamydomonas* cells with  $\text{Ni}^{2+}$  may cause oxidative damage, which in turn activates degradative pathways, including autophagy, as a defense mechanism to clear impaired components.

To further qualify the observed overlap between the  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  data sets, we also compared those transcripts that increased in abundance in the CRR1 strain to those transcripts that increased in abundance following treatment of cells under conditions that are known to induce autophagy (ClpP1 depletion and rapamycin treatment [19, 23]) and conditions that have yet to be linked to autophagy induction in *Chlamydomonas*: singlet oxygen



**FIG 5** Transcriptomic analysis of  $50 \mu\text{M}$   $\text{Ni}^{2+}$ -treated cultures reveals a global impact on protein metabolism and overlap with the  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced stress response. (a) Schematic of the data sets used for the comparison shown in panel b. Ni refers to  $\text{Ni}^{2+}$  ions. (b) Venn diagram showing the overlap between the different sets of genes indicated in panel a. A, transcripts with a higher abundance in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  in the complemented (CRR1) strain; B, transcripts with a higher abundance in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  in the CRR1- $\Delta\text{Cys}$  strain; C, transcripts in the overlap of A and B whose abundance in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  was not significantly different between the two strains. (c) Functional classification of the CRR1-independent  $\text{Ni}^{2+}$ -responsive transcriptome. The 275 transcripts with similar transcript abundances identified in the CRR1 and CRR1- $\Delta\text{Cys}$  strains were clustered on the basis of their predicted function. (d) Venn diagram showing the overlap between transcripts with increased abundance in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



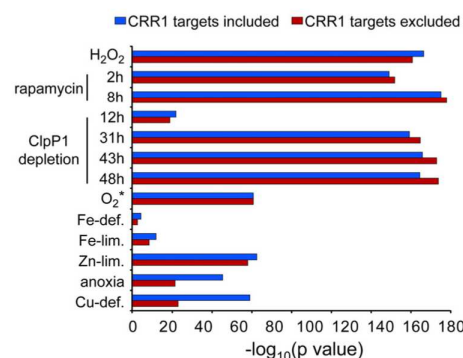


**FIG 6** Effect of the antioxidant NAC on Ni<sup>2+</sup>-induced autophagy. The protein abundance and lipidation of ATG8 (a) and the accumulation of ATG8 and *GSTS1* gene transcripts (b) in *Chlamydomonas* cells treated with 100  $\mu$ M Ni<sup>2+</sup> for 8 h in the presence or absence of 10 mM NAC were determined. (a) Immunoblot analysis with an anti-FKBP12 antibody was used as loading control. (b) mRNA levels were determined by qPCR and normalized to those for control cells (for which the level of mRNA expression was given a value of 1). The data are represented as the mean  $\pm$  standard deviation from three independent experiments.

(46), acclimation to dark anoxia (47), poor Fe nutrition (48), poor Cu nutrition (49), and poor Zn nutrition (50). In addition to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> data set, we found that the most significant overlaps with Ni<sup>2+</sup> induction in the CRR1 strain were with 8 h of rapamycin addition and 48 h of ClpP1 depletion (Fig. 7). There was a moderate overlap with singlet oxygen and Zn limitation, whereas the two Fe nutrition data sets had relatively little overlap with the data set for the Ni<sup>2+</sup> response. Given the previous observation that Ni<sup>2+</sup>, anoxia, and Cu deficiency all lead to the induced expression of a core set of CRR1 targets, we found that subtraction of CRR1 targets (49) affected only the overlap between Ni<sup>2+</sup> and either anoxia or Cu deficiency.

## DISCUSSION

In this study, we showed that exposure of *Chlamydomonas* cells to a high concentration of Ni<sup>2+</sup> results in the upregulation of *ATG8* expression, an increased ATG8 protein abundance, and the detection of lipidated ATG8 forms (Fig. 1), all of which are landmarks of autophagy activation (9, 19). These results suggest that excess Ni<sup>2+</sup> may trigger autophagy to mitigate the toxic effect of this metal in *Chlamydomonas*. Accordingly, it has been reported that similar concentrations of Ni<sup>2+</sup> have a negative effect on *Chlamydomonas* cell growth (55). Immunofluorescence microscopy assays also revealed that the cellular localization of ATG8 drastically changed when cells were exposed to excess Ni<sup>2+</sup>, which resulted in the detection of this protein as intense spots (Fig. 1). A similar ATG8 localization pattern has been reported in *Chlamydomonas* cells subjected to different stress conditions, including oxidative



**FIG 7** Overlap between the Ni<sup>2+</sup> response in strain CRR1 and published stress transcriptomes. *P* values for enrichment of transcripts that were more abundant in the presence of Ni<sup>2+</sup> than in the absence of Ni<sup>2+</sup> in the CRR1 strain and in several published transcriptomes were calculated (using the hypergeometric distribution) after rose bengal (O<sub>2</sub><sup>•</sup>) addition, ClpP1 depletion, rapamycin addition, growth under anoxic conditions, Fe<sup>2+</sup> limitation (Fe-lim.), Fe<sup>2+</sup> deficiency (Fe-def.), Zn<sup>2+</sup> limitation (Zn-lim.), and Cu<sup>2+</sup> deficiency (Cu-def.). The analysis was performed with and without including CRR1 target transcripts in the data sets.

stress, photooxidative damage, or ER stress (19–21). Whether these ATG8-containing spots label autophagosome-like structures or vacuoles remains to be explored.

In addition to Ni<sup>2+</sup>, we found that copper and cobalt also trigger autophagy in *Chlamydomonas*, although Ni<sup>2+</sup> appeared to be more effective at similar metal concentrations (Fig. 3; see also Fig. S2 in the supplemental material). Activation of autophagy by Ni<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, or Co<sup>2+</sup> has not been previously reported in photosynthetic organisms, although in mammalian cancer cells, copper complexes appear to induce oxidative stress, which in turn triggers autophagy (63, 64). Unlike the effect of Ni<sup>2+</sup>, copper, or cobalt, no significant effect of Cd<sup>2+</sup> or Hg<sup>2+</sup> ions, even at high concentrations (150  $\mu$ M and 2  $\mu$ M, respectively), on ATG8 was observed (Fig. 3; see also Fig. S2 in the supplemental material). Similar amounts of these two metals have previously been shown to alter gene expression in *Chlamydomonas* (29, 65–67), although to our knowledge no effect on autophagy genes in algae or plants has been reported. However, cadmium toxicity has been linked to the activation of autophagy in human cells on the basis of the tumorigenic and cell death-inducing properties of this metal (68). The molecular mechanism by which Cd<sup>2+</sup> activates autophagic programs in human cells is unclear, although it may involve ROS formation (69–71). Cadmium has also been shown to induce autophagy in sea urchin embryos, but the underlying signaling pathway remains to be identified (72). In photosynthetic systems, it has been reported that Cd<sup>2+</sup> exposure appears to promote the formation of vacuole-like structures in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*, although no specific autophagy marker was analyzed in that study (73).

Our results demonstrate that Ni<sup>2+</sup>-induced autophagy is independent of the transcription factor CRR1 in *Chlamydomonas* (Fig. 4). CRR1 is a key regulator of the acclimation of *Chlamydomonas* cells to copper deficiency (35, 74, 75) and is required for the Ni<sup>2+</sup>-induced expression of genes within the Cu-responsive regulon, likely because Ni<sup>2+</sup> interferes with Cu sensing by CRR1 (35, 53). The finding that Ni<sup>2+</sup> activates autophagy in CRR1-deficient cells indicates that this transcription factor is fully dispensable for

$\text{Ni}^{2+}$ -induced autophagy and that the misregulation of the CRR1 regulon by  $\text{Ni}^{2+}$  does not play a significant role in autophagy induction. Genome-wide transcript abundance analysis of *Chlamydomonas* cells with impaired CRR1 function (CRR1- $\Delta\text{Cys}$  cells) revealed that there is a core set of 275 genes whose transcripts are similarly upregulated by  $\text{Ni}^{2+}$  in both CRR1 and CRR1- $\Delta\text{Cys}$  cells (Fig. 5; see also Table S1 in the supplemental material). The autophagy genes *ATG3* and *ATG8* are included in this set of CRR1-independent  $\text{Ni}^{2+}$ -responsive genes, in close agreement with the finding that this transcription factor is dispensable for  $\text{Ni}^{2+}$ -induced autophagy.

The upregulation of genes coding for proteasome subunits, ubiquitin-related proteins, and several proteases in  $\text{Ni}^{2+}$ -treated cells supports the conclusion that metal stress must lead to massive damage in the cell that needs to be repaired to recover cell homeostasis. The considerable overlap between  $\text{H}_2\text{O}_2$ -responsive genes and the 275  $\text{Ni}^{2+}$ -induced, CRR1-independent genes (Fig. 5; see also Table S1 in the supplemental material), together with the upregulation of two sentinel oxidative stress-regulated genes (see Fig. S3 in the supplemental material) and the decreased activation of autophagy observed in the presence of an antioxidant (Fig. 6), strongly suggests that this metal may lead to oxidative stress in *Chlamydomonas*, which in turn triggers autophagy. Accordingly, the ROS inducers  $\text{H}_2\text{O}_2$  and methyl viologen have been shown to activate autophagy in *Chlamydomonas* (19, 21). A similar response may occur in cells exposed to  $\text{Co}^{2+}$  or  $\text{Cu}^{2+}$ , since high concentrations of these metals cause oxidative stress in plants and algae (30, 76–78).

A link between exposure to metals and oxidative stress has been shown in plants and algae (28–32, 76, 79), although we cannot rule out the possibility that the activation of autophagy by  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , or  $\text{Cu}^{2+}$  might be due to the effect of these metals on some metalloproteins by displacing cognate metals, such as  $\text{Fe}^{2+}$  or  $\text{Mn}^{2+}$ , from the active site and thus interfering with the activity of these enzymes, which may ultimately lead to an autophagy response. Moreover, this interpretation is compatible with the activation of autophagy by oxidative damage, since  $\text{Ni}^{2+}$  and other metals may indirectly cause oxidative stress by mismetallating and inactivating ROS-detoxifying enzymes (80).

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (grant BFU2012-35913 to J.L.C.), by the Junta de Andalucía (grant CVI-7336 to J.L.C.), and by National Institutes of Health (NIH) grants GM42143 and R24 GM092473 to S.S.M. I.K.B. and C.E.B.-H. were supported by training grants from the NIH (T32ES015457 and GM100753, respectively).

We thank Sorel Fitz-Gibbon for realignments of RNA-Seq reads.

## REFERENCES

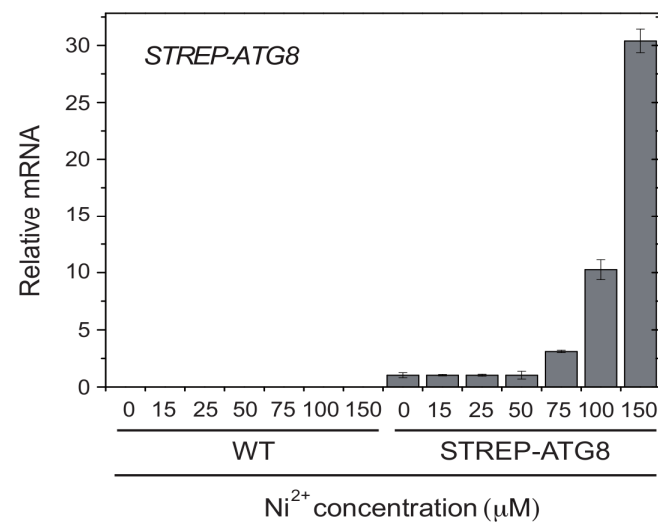
- Li F, Vierstra RD. 2012. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* 17:526–537. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.006>.
- Liu Y, Bassham DC. 2012. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annu Rev Plant Biol* 63:215–237. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105441>.
- Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:458–467. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2708>.
- Xie Z, Klionsky DJ. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 9:1102–1109. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb1007-1102>.
- Boya P, Reggiori F, Codogno P. 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15:713–720. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2788>.
- Mizushima N, Levine B. 2010. Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12:823–830. <http://dx.doi.org/10.1038/ncb0910-823>.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. 2014. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24:24–41. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2013.168>.
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27:107–132. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J, Aleo MF, Alirezaci M, Almasan A, Almonte-Becerril M, Amano A, Amaravadi R, Amarnath S, Amer AO, Andrieu-Abadie N, Anantharam V, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Aoki H, Apostolova N, Arancia G, Aris JP, Asanuma K, Asare NY, Ashida H, Askanas V, Askew DS, Auberger P, Baba M, Backues SK, Baehrecke EH, Bahr BA, Bai XY, Bailly Y, Baiocchi R, Baldini G, et al. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445–544. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.19496>.
- Avin-Wittenberg T, Honig A, Galili G. 2012. Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 249:285–299. <http://dx.doi.org/10.1007/s00709-011-0296-z>.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K. 2006. Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* 2:2–11. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.2092>.
- Thompson AR, Vierstra RD. 2005. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* 8:165–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.013>.
- Diaz-Troya S, Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. 2008. The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4:851–865. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.6555>.
- Jiang Q, Zhao L, Dai J, Wu Q. 2012. Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. *PLoS One* 7:e41826. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0041826>.
- Aksoy M, Pootakham W, Grossman AR. 2014. Critical function of a *Chlamydomonas reinhardtii* putative polyphosphate polymerase subunit during nutrient deprivation. *Plant Cell* 26:4214–4229. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.129270>.
- Davey MP, Horst I, Duong GH, Tomsett EV, Litvinenko AC, Howe CJ, Smith AG. 2014. Triacylglyceride production and autophagous responses in *Chlamydomonas reinhardtii* depend on resource allocation and carbon source. *Eukaryot Cell* 13:392–400. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00178-13>.
- Goodenough U, Blaby I, Casero D, Gallaher SD, Goodson C, Johnson S, Lee JH, Merchant SS, Pellegrini M, Roth R, Rusch J, Singh M, Umen JG, Weiss TL, Wulan T. 2014. The path to triacylglyceride obesity in the sta6 strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 13:591–613. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00013-14>.
- Goodson C, Roth R, Wang ZT, Goodenough U. 2011. Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryot Cell* 10:1592–1606. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.05242-11>.
- Perez-Perez ME, Florencio FJ, Crespo JL. 2010. Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 152:1874–1888. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.152520>.
- Perez-Martin M, Perez-Perez ME, Lemaire SD, Crespo JL. 2014. Oxidative stress contributes to autophagy induction in response to endoplasmic reticulum stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 166:997–1008. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.114.243659>.
- Perez-Perez ME, Couso I, Crespo JL. 2012. Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* 8:376–388. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.18864>.
- Vallador L, Furuhashi T, Hanak AM, Weckwerth W. 2013. Systemic cold stress adaptation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Cell Proteomics* 12:2032–2047. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M112.026765>.
- Ramundo S, Casero D, Muhlhaut T, Hemme D, Sommer F, Crevecoeur M, Rahire M, Schroda M, Rusch J, Goodenough U, Pellegrini M, Perez-Perez ME, Crespo JL, Schaad O, Civic N, Rochaix JD. 2014. Conditional depletion of the *Chlamydomonas* chloroplast ClpP protease activates nuclear



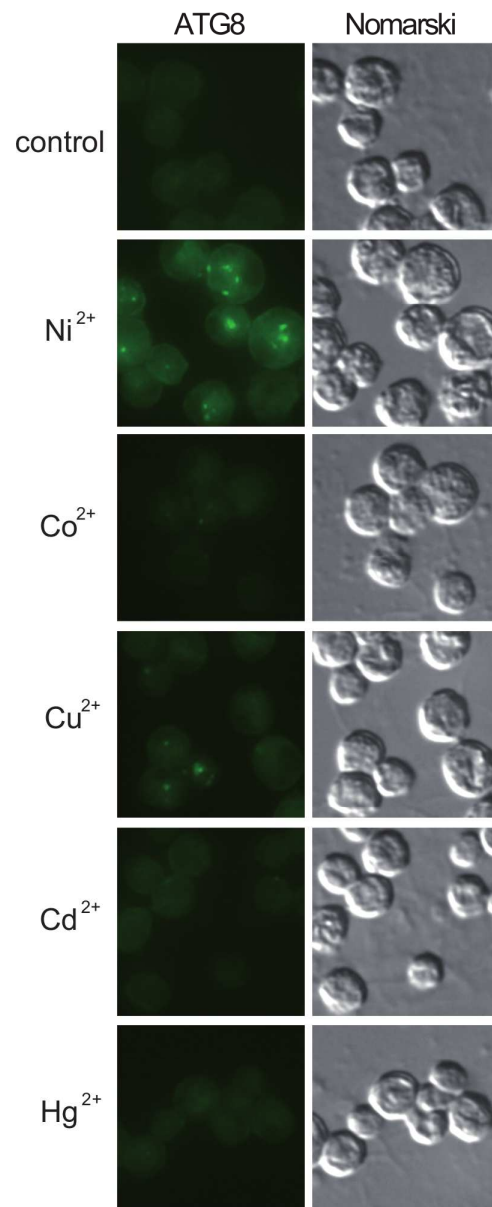
- genes involved in autophagy and plastid protein quality control. *Plant Cell* 26:2201–2222. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.114.124842>.
24. Zhao L, Dai J, Wu Q. 2014. Autophagy-like processes are involved in lipid droplet degradation in *Auxenochlorella protothecoides* during the heterotrophy-autotrophy transition. *Front Plant Sci* 5:400. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2014.00400>.
  25. Schatz D, Shemi A, Rosenwasser S, Sabanay H, Wolf SG, Ben-Dor S, Vardi A. 2014. Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytol* 204:854–863. <http://dx.doi.org/10.1111/nph.13008>.
  26. Minina EA, Bozhkov PV, Hofius D. 2014. Autophagy as initiator or executioner of cell death. *Trends Plant Sci* 19:692–697. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2014.07.007>.
  27. Xiong Y, Contento AL, Bassham DC. 2007. Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in Arabidopsis. *Autophagy* 3:257–258. <http://dx.doi.org/10.4161/auto.3847>.
  28. Glaesener AG, Merchant SS, Blaby-Haas CE. 2013. Iron economy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Front Plant Sci* 4:337. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00337>.
  29. Jagers A, Blust R, De Coen W, Griffin JL, Jones OA. 2013. An omics based assessment of cadmium toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol* 126:355–364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.09.007>.
  30. Ravet K, Pilon M. 2013. Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 19:919–932. <http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.5084>.
  31. Sharma SS, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14:43–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.007>.
  32. Stoiber TL, Shafer MM, Armstrong DE. 2013. Induction of reactive oxygen species in *Chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environ Toxicol* 28:516–523. <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20743>.
  33. Blaby-Haas CE, Merchant SS. 2012. The ins and outs of algal metal transport. *Biochim Biophys Acta* 1823:1531–1552. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.04.010>.
  34. Blaby-Haas CE, Merchant SS. 2013. Iron sparing and recycling in a compartmentalized cell. *Curr Opin Microbiol* 16:677–685. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2013.07.019>.
  35. Sommer F, Kropat J, Malasarn D, Grossoehme NE, Chen X, Giedroc DP, Merchant SS. 2010. The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains. *Plant Cell* 22:4098–4113. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.110.080069>.
  36. Harris EH. 1989. The *Chlamydomonas* sourcebook. Academic Press, San Diego, CA.
  37. Kindle KL. 1998. Nuclear transformation: technology and applications, p 41–61. In: Rochaix JD, Goldschmidt-Clermont M, Merchant S (ed), *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
  38. Hill KL, Li HH, Singer J, Merchant S. 1991. Isolation and structural characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* gene for cytochrome *c<sub>6</sub>*. Analysis of the kinetics and metal specificity of its copper-responsive expression. *J Biol Chem* 266:15060–15067.
  39. Schmidt TG, Skerra A. 2007. The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins. *Nat Protoc* 2:1528–1535. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.209>.
  40. Crespo JL, Diaz-Troya S, Florencio FJ. 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 139:1736–1749. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.105.070847>.
  41. Pootakham W, Gonzalez-Ballester D, Grossman AR. 2010. Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 153:1653–1668. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.157875>.
  42. Fischer BB, Dayer R, Schwarzenbach Y, Lemaire SD, Behra R, Liedtke A, Eggen RI. 2009. Function and regulation of the glutathione peroxidase homologous gene *GPXH/GPX5* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 71:569–583. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-009-9540-8>.
  43. Fischer BB, Ledford HK, Wakao S, Huang SG, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, Koller A, Eggen RI, Niyogi KK. 2012. Singlet oxygen resistant 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E1302–E1311. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1116843109>.
  44. Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 7:562–578. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2012.016>.
  45. Urzica EI, Adler LN, Page MD, Linster CL, Arbing MA, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, Clarke SG. 2012. Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the *VTC2* gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase. *J Biol Chem* 287:14234–14245. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.341982>.
  46. Wakao S, Chin BL, Ledford HK, Dent RM, Casero D, Pellegrini M, Merchant SS, Niyogi KK. 2014. Phosphoprotein SAK1 is a regulator of acclimation to singlet oxygen in *Chlamydomonas reinhardtii*. *eLife* 3:e02286. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.02286>.
  47. Hemschemeier A, Casero D, Liu B, Benning C, Pellegrini M, Happe T, Merchant SS. 2013. Copper response regulator1-dependent and -independent responses of the *Chlamydomonas reinhardtii* transcriptome to dark anoxia. *Plant Cell* 25:3186–3211. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.113.115741>.
  48. Urzica EI, Casero D, Yamasaki H, Hsieh SI, Adler LN, Karpowicz SJ, Blaby-Haas CE, Clarke SG, Loo JA, Pellegrini M, Merchant SS. 2012. Systems and trans-system level analysis identifies conserved iron deficiency responses in the plant lineage. *Plant Cell* 24:3921–3948. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.112.102491>.
  49. Castruita M, Casero D, Karpowicz SJ, Kropat J, Vieler A, Hsieh SI, Yan W, Cokus S, Loo JA, Benning C, Pellegrini M, Merchant SS. 2011. Systems biology approach in *Chlamydomonas* reveals connections between copper nutrition and multiple metabolic steps. *Plant Cell* 23:1273–1292. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.084400>.
  50. Malasarn D, Kropat J, Hsieh SI, Finazzi G, Casero D, Loo JA, Pellegrini M, Wollman FA, Merchant SS. 2013. Zinc deficiency impacts CO<sub>2</sub> assimilation and disrupts copper homeostasis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 288:10672–10683. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.455105>.
  51. Howe G, Merchant S. 1992. Heavy metal-activated synthesis of peptides in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 98:127–136. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.98.1.127>.
  52. Macfie S, Tarmohamed Y, Welbourn P. 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. *Arch Environ Contam Toxicol* 27:454–458.
  53. Quinn JM, Kropat J, Merchant S. 2003. Copper response element and Crr1-dependent Ni<sup>2+</sup>-responsive promoter for induced, reversible gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 2:995–1002. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.2.5.995-1002.2003>.
  54. Simon DF, Descombes P, Zerges W, Wilkinson KJ. 2008. Global expression profiling of *Chlamydomonas reinhardtii* exposed to trace levels of free cadmium. *Environ Toxicol Chem* 27:1668–1675. <http://dx.doi.org/10.1897/07-649.1>.
  55. Zheng Q, Cheng ZZ, Yang ZM. 2013. HSN3 mediates adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii* to excess nickel. *Plant Cell Physiol* 54:1951–1962. <http://dx.doi.org/10.1093/pcp/pct130>.
  56. Ferrante P, Catalanotti C, Bonente G, Giuliano G. 2008. An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLoS One* 3:e3200. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0003200>.
  57. Ferrante P, Diener DR, Rosenbaum JL, Giuliano G. 2011. Nickel and low CO<sub>2</sub>-controlled motility in *Chlamydomonas* through complementation of a paralyzed flagella mutant with chemically regulated promoters. *BMC Plant Biol* 11:22. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2229-11-22>.
  58. Rochaix JD, Surzycki R, Ramundo S. 2014. Tools for regulated gene expression in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Methods Mol Biol* 1132:413–424. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6\\_28](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-995-6_28).
  59. Surzycki R, Cournac L, Peltier G, Rochaix JD. 2007. Potential for hydrogen production with inducible chloroplast gene expression in *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:17548–17553. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0704205104>.
  60. Merchant S, Hill K, Howe G. 1991. Dynamic interplay between two copper-titrating components in the transcriptional regulation of cyt *c<sub>6</sub>*. *EMBO J* 10:1383–1389.
  61. Fischer BB, Krieger-Liszakay A, Hideg E, Snrychova I, Wiesendanger M, Eggen RI. 2007. Role of singlet oxygen in chloroplast to nucleus retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* 581:5555–5560. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2007.11.003>.
  62. Ledford HK, Chin BL, Niyogi KK. 2007. Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 6:919–930. <http://dx.doi.org/10.1128/EC.00207-06>.

63. Trejo-Solis C, Jimenez-Farfan D, Rodriguez-Enriquez S, Fernandez-Valverde F, Cruz-Salgado A, Ruiz-Azuara L, Sotelo J. 2012. Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and JNK activation. *BMC Cancer* 12:156. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-12-156>.
64. Zhong W, Zhu H, Sheng F, Tian Y, Zhou J, Chen Y, Li S, Lin J. 2014. Activation of the MAPK11/12/13/14 (p38 MAPK) pathway regulates the transcription of autophagy genes in response to oxidative stress induced by a novel copper complex in HeLa cells. *Autophagy* 10:1285–1300. <http://dx.doi.org/10.4161/autophagy.28789>.
65. Gillet S, Decottignies P, Chardonnet S, Le Marechal P. 2006. Cadmium response and redoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*: a proteomic approach. *Photosynth Res* 89:201–211. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-006-9108-2>.
66. Lemaire S, Keryer E, Stein M, Schepens II, Issakidis-Bourguet E, Gerard-Hirne C, Miginiac-Maslow M, Jacquot JP. 1999. Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 120:773–778. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.120.3.773>.
67. Quinn JM, Eriksson M, Moseley JL, Merchant S. 2002. Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiol* 128:463–471. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010694>.
68. Chiarelli R, Roccheri MC. 2012. Heavy metals and metalloids as autophagy inducing agents: focus on cadmium and arsenic. *Cells* 1:597–616. <http://dx.doi.org/10.3390/cells1030597>.
69. Son YO, Wang X, Hitron JA, Zhang Z, Cheng S, Budhraj A, Ding S, Lee JC, Shi X. 2011. Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 255:287–296. <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2011.06.024>.
70. Wang SH, Shih YL, Kuo TC, Ko WC, Shih CM. 2009. Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3 $\beta$  in mesangial cells. *Toxicol Sci* 108:124–131. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfn266>.
71. Yang LY, Wu KH, Chiu WT, Wang SH, Shih CM. 2009. The cadmium-induced death of mesangial cells results in nephrotoxicity. *Autophagy* 5:571–572. <http://dx.doi.org/10.4161/autophagy.5.4.8311>.
72. Chiarelli R, Agnello M, Roccheri MC. 2011. Sea urchin embryos as a model system for studying autophagy induced by cadmium stress. *Autophagy* 7:1028–1034. <http://dx.doi.org/10.4161/autophagy.7.9.16450>.
73. Andosch A, Affenzeller MJ, Lutz C, Lutz-Meindl U. 2012. A freshwater green alga under cadmium stress: ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *J Plant Physiol* 169:1489–1500. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2012.06.002>.
74. Eriksson M, Moseley JL, Tottey S, Del Campo JA, Quinn J, Kim Y, Merchant S. 2004. Genetic dissection of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* distinguishes regulatory and target genes. *Genetics* 168:795–807. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.104.030460>.
75. Kropat J, Tottey S, Birkenbihl RP, Depege N, Huijser P, Merchant S. 2005. A regulator of nutritional copper signaling in *Chlamydomonas* is an SBP domain protein that recognizes the GTAC core of copper response element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:18730–18735. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507693102>.
76. Jagers A, Van der Ven K, Moens L, Robbens J, Potters G, Guisez Y, Blust R, De Coen W. 2006. Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. *Aquat Toxicol* 80:249–260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.09.002>.
77. Merchant SS, Allen MD, Kropat J, Moseley JL, Long JC, Tottey S, Terauchi AM. 2006. Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* 1763:578–594. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.007>.
78. Tan YF, O'Toole N, Taylor NL, Millar AH. 2010. Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function. *Plant Physiol* 152:747–761. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.109.147942>.
79. Rodrigo-Moreno A, Poschenrieder C, Shabala S. 2013. Transition metals: a double edge sword in ROS generation and signaling. *Plant Signal Behav* 8:e23425. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.23425>.
80. Imlay JA. 2014. The mismetallation of enzymes during oxidative stress. *J Biol Chem* 289:28121–28128. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R114.588814>.

#### **4.2.1 Material suplementario**



**Fig. S1**



**Fig. S2**

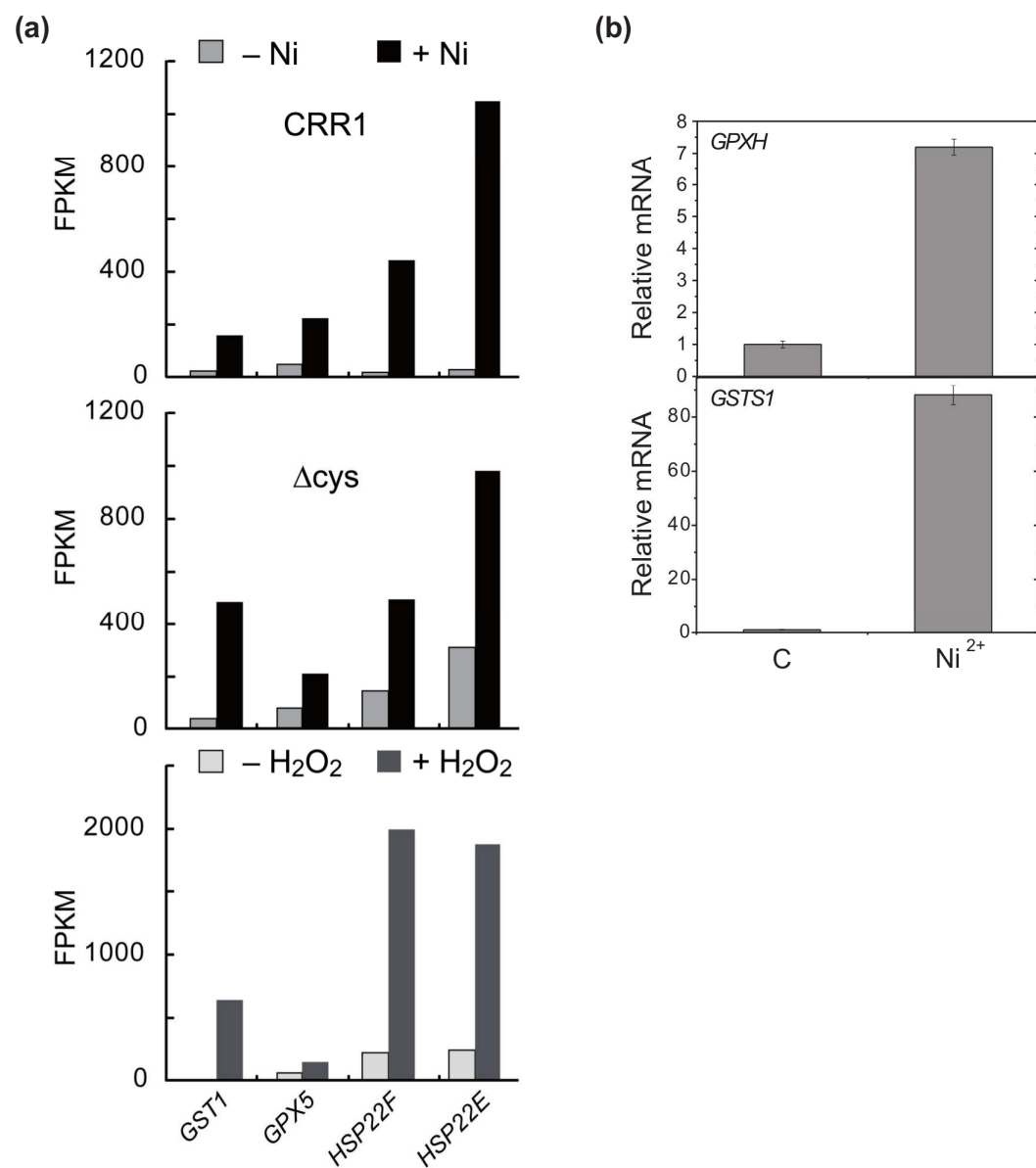


Fig. S3



**TABLA S1:** Se adjunta como archive Excel en CD-ROM adjunto.

## 5 RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

### 5.1 El estrés en el retículo endoplasmático activa la autofagia en *Chlamydomonas*.

En la presente Tesis doctoral se ha demostrado que el estrés en el retículo endoplasmático induce fuertemente la autofagia en *Chlamydomonas*. Para ello, se han empleado distintos agentes inductores de estrés en el retículo endoplasmático, y se ha analizado la inducción de la autofagia mediante distintos métodos.

En primer lugar, se han identificado marcadores de estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*: *CAL2*, *ERO1*, *PDI6* y *Rb60*. *CAL2*, que ya ha sido utilizado como marcador de estrés en el retículo endoplasmático en *Arabidopsis* (Martinez, 2003), codifica para la chaperona Calreticulina 2, localizada en el retículo endoplasmático. La Oxidoreductasa del retículo endoplasmático *ERO1*, que no descrita sido descrita anteriormente en algas, participa en la formación de los puentes disulfuro dentro del orgánulo, regenerando la forma activa de las enzimas PDI (Frand and Kaiser, 1999; Ozgur et al., 2014). *Rb60* ha sido descrita anteriormente en *Chlamydomonas*, donde se localiza tanto en el retículo endoplasmático como en el cloroplasto (Levitan et al., 2005). En esta Tesis se identifica una nueva enzima PDI en *Chlamydomonas*, que denominamos *PDI6*. Se comprueba que contiene un dominio J en su extremo N-terminal, que se encuentra conservado en enzimas del retículo implicadas en el reconocimiento de proteínas no plegadas correctamente (Schroda, 2004).

Se ha demostrado que los genes *CAL2*, *ERO1* y *PDI6* se encuentran conservados en *Chlamydomonas*, y que pueden ser empleados como marcadores de estrés en el retículo endoplasmático en este organismo modelo. La transcripción de estos genes se induce fuertemente cuando las células están sometidas a estrés en el retículo endoplasmático, pero no ante otros tipos de estrés, tales como el estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno, metilviológeno o norflurazon.

Como inductor de estrés en el retículo endoplasmático, se ha empleado la tunicamicina, un antibiótico que inhibe la N-glicosilación de las proteínas en dicho orgánulo (Hori and Elbein, 1981; Leavitt et al., 1997; Schneider et al., 1978), provocando una acumulación de proteínas con plegamiento incorrecto y, por tanto, estrés en el retículo endoplasmático. Se ha demostrado que la tunicamicina induce estrés en el retículo endoplasmático de *Chlamydomonas*, ya que activa la expresión de los marcadores de estrés en el retículo *CAL2*, *ERO1*, *PDI6* y *Rb60*.

La tunicamicina activa además el proceso de autofagia en esta microalga. En estudios anteriores, se demostró que la tunicamicina provoca la acumulación de la proteína ATG8 y la aparición de formas lipidadas de dicha proteína, además de cambiar drásticamente su localización celular (Perez-Perez et al., 2010). En esta Tesis se ha

demostrado que la tunicamicina además induce transcripcionalmente los genes *ATG3* y *ATG8* de *Chlamydomonas*. El gen *ATG8* es, como se ha explicado anteriormente, un marcador celular y molecular de la autofagia. La proteína ATG8 es esencial para la autofagia, se asocia a la membrana del autofagosoma y participa en su formación y expansión (Yang and Klionsky, 2009). ATG3 es una enzima tipo E2 que participa en la lipidación de ATG8 (Nakatogawa et al., 2009) y que es necesaria para que ATG8 pueda asociarse a la membrana del autofagosoma.

La tapsigargina también ha sido empleada como inductor de estrés en el retículo endoplasmático en mamíferos (Waser et al., 1997). La tapsigargina es una lactona que actúa inhibiendo las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo endoplasmático (Lytton et al., 1991; Thastrup et al., 1990), lo que origina un estrés al disminuir los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  dentro del orgánulo. En este trabajo se ha demostrado que la tapsigargina genera estrés en el retículo endoplasmático de *Chlamydomonas*, ya que induce la expresión de los marcadores de estrés en el retículo endoplasmático *ERO1* y *PDI6* con igual magnitud que la tunicamicina. Además, se ha observado que esta droga, al igual que la tunicamicina, induce la expresión del gen *ATG8* en *Chlamydomonas* y aumenta los niveles de dicha proteína así como su maduración, por lo que se concluye que la tapsigargina activa la autofagia en esta microalga.

Por último, se ha demostrado que el ditiotreitól o DTT induce estrés en el retículo endoplasmático y activa la autofagia en *Chlamydomonas*. El DTT es un potente agente reductor que, al reducir los puentes disulfuro de las proteínas que se encuentran en fase de plegamiento dentro del retículo endoplasmático, genera una acumulación de proteínas plegadas incorrectamente y por tanto estrés en dicho orgánulo (Lodish and Kong, 1993). En esta Tesis Doctoral, se ha demostrado que el DTT induce los marcadores de estrés en el retículo endoplasmático *CAL2*, *ERO1*, *PDI6* y *Rb60* de *Chlamydomonas*. Por otra parte, también se ha observado que el DTT activa la expresión del gen *ATG8* y aumenta los niveles de dicha proteína y de su forma lipidada. Además, se ha demostrado por técnicas de microscopía de fluorescencia que el DTT cambia drásticamente la distribución celular de ATG8, detectándose dicha proteína en múltiples puntos aparentemente localizados fuera del cloroplasto. En conjunto, estos resultados indican que el DTT induce la autofagia en *Chlamydomonas*.

## **5.2 El estrés en el retículo endoplasmático induce estrés oxidativo en *Chlamydomonas*.**

Se ha demostrado que el estrés en el retículo endoplasmático da lugar a estrés oxidativo en *Chlamydomonas*. La tunicamicina, que como ya se ha mencionado genera estrés en el retículo endoplasmático, induce la expresión de los marcadores de estrés oxidativo *GSTS1* y *GPXH*. Las enzimas GSTS1 (Glutación S-Transferasa 1) y GPXH (Glutación Peroxidasa) participan en la síntesis de glutatión (GSH), péptido muy

abundante en células fotosintéticas y con una gran capacidad antioxidante (Noctor et al., 2012). El hecho de que la tunicamicina induzca la expresión de estos genes indica que las células se encuentran ante una situación de estrés oxidativo y necesitan sintetizar GSH para combatir dicho estrés.

Para confirmar este resultado, se determinaron los niveles de glutatión oxidado (GSSG) y reducido (GSH) en células tratadas con tunicamicina. Nuestros resultados demuestran que la tunicamicina provoca una disminución de los niveles de glutatión reducido y un aumento de los niveles de glutatión oxidado en las células, es decir, disminuye el ratio GSH/GSSG, que es un indicativo de estrés oxidativo (Noctor and Foyer, 1998).

Por otro lado, el DTT (inductor de estrés en el retículo endoplasmático) también genera estrés oxidativo, ya que al igual que la tunicamicina induce la expresión de los marcadores de estrés oxidativo *GSTS1* y *GPXH*. En el interior del retículo endoplasmático, la enzima PDI cataliza la formación de los puentes disulfuro, en un ciclo en el que la forma oxidada de dicha enzima se reduce generando un puente disulfuro, y tiene que volver a regenerarse su forma oxidada para mantener su actividad. La oxidoreductasa ERO1 se encarga de regenerar la forma oxidada de PDI, reduciendo una molécula de oxígeno por cada puente disulfuro y generando así agua oxigenada en la reacción global (Appenzeller-Herzog, 2011; Tu and Weissman, 2004). El DTT actúa en el retículo endoplasmático reduciendo los puentes disulfuro generados por PDI. De este modo, los puentes disulfuro vuelven a generarse una y otra vez, produciendo mayor cantidad de agua oxigenada y, por tanto, estrés oxidativo.

No obstante, cabe destacar que la inducción de estrés oxidativo por parte del DTT no puede deberse únicamente a su efecto sobre el retículo endoplasmático, ya que por su naturaleza como agente reductor el DTT afecta a múltiples compartimentos celulares. Es decir, el DTT no provoca daños exclusivamente en el retículo endoplasmático, mientras que la tunicamicina sí es específica de dicho orgánulo.

### **5.3 El estrés oxidativo participa como inductor de la autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*.**

En la presente Tesis se ha demostrado que el estrés oxidativo actúa como inductor de la autofagia en respuesta a otros tipos de estrés, tales como el estrés en el retículo endoplasmático o la toxicidad generada por metales pesados. La hipótesis de que ROS puede actuar como molécula señalizadora en la inducción de autofagia ha sido anteriormente propuesta en mamíferos (Scherz-Shouval and Elazar, 2007, 2011; Scherz-Shouval et al., 2007). Por tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis indican por primera vez que ROS participa en la inducción de autofagia en organismos fotosintéticos.

Por un lado, se ha demostrado que el GSH, antioxidante encargado de mantener el estado redox celular, suprime parcialmente la autofagia inducida por estrés en el retículo endoplasmático. Al tratar células de *Chlamydomonas* con tunicamicina y GSH, se ha comprobado que el GSH es capaz de suprimir parcialmente el aumento en los niveles de transcrito del gen *ATG8* y en la acumulación de dicha proteína. Estos resultados indican que la presencia de GSH inhibe la autofagia inducida por tunicamicina, a pesar de que se mantiene el estrés en el retículo endoplasmático, ya que los marcadores de estrés en el retículo *PDI6*, *CAL2*, *ERO1* y *Rb60* se expresan de forma similar a como lo hacen en células tratadas sólo con tunicamicina.

En concordancia con estos resultados, se ha observado que el GSH disminuye la toxicidad de la tunicamicina, aumentando significativamente la viabilidad en células tratadas con esta droga tanto en medio sólido como en medio líquido. Nuestros resultados demuestran que la tunicamicina induce la expresión del marcador de muerte celular *DAD1* (Defender Against Death 1) (Moharikar et al., 2007), pero al tratar simultáneamente las células con tunicamicina y GSH la expresión de dicho marcador disminuye de forma significativa, lo que confirma que el GSH favorece la supervivencia en células tratadas con tunicamicina.

Con objeto de estudiar en más detalle la conexión entre el estrés oxidativo y la inducción de autofagia, se ha estudiado el efecto que provoca la tunicamicina en el mutante *sor1*. El gen *SOR1* de *Chlamydomonas* codifica para un factor transcripcional que parece regular la expresión de muchos genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo y su mutación confiere una mayor resistencia a estrés oxidativo, sobre todo a singlete de oxígeno (Fischer et al., 2012). En concordancia con estas observaciones, nuestros resultados indican que este mutante presenta unos niveles de transcrito del gen *GSTS1* significativamente mayores que la estirpe silvestre, niveles que aumentan aún más al tratar las células con tunicamicina. Además, se ha observado que la tunicamicina genera una mayor activación de la autofagia en el mutante *sor1*, ya que en comparación con la estirpe silvestre presenta unos niveles de transcrito del gen *ATG8* más elevados, una mayor acumulación de proteína ATG8 y una mayor abundancia de la forma lipidada. Todos estos resultados sugieren una conexión entre la respuesta a estrés oxidativo con la correcta regulación de la autofagia en *Chlamydomonas*.

Por otro lado, se ha estudiado si la adición de GSH exógeno es capaz de suprimir la autofagia generada por otros inductores de estrés en el retículo endoplasmático. Con este fin, se trataron células de *Chlamydomonas* con DTT y GSH simultáneamente y se ha comprobado que el GSH disminuye la transcripción del gen *ATG8*, aunque también es capaz de disminuir la expresión de los genes *PDI6*, *CAL2*, *ERO1* y *Rb60*. Por tanto, en base a estos resultados concluimos que el GSH suprime el efecto del DTT sobre el retículo endoplasmático, lo que se traduce en una disminución en los niveles de autofagia.

#### 5.4 La toxicidad inducida por metales pesados activa la autofagia en *Chlamydomonas*.

En la presente Tesis se ha demostrado que la toxicidad inducida por algunos metales pesados activa la autofagia en *Chlamydomonas*. En concreto,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  inducen la autofagia, ya que conducen a activación transcripcional de *ATG8*, acumulación de dicha proteína y aparición de su forma lipidada, así como a cambios en la distribución celular de *ATG8*, que muestra un patrón de localización en un número variable de puntos en presencia de dichos metales.

En el caso del  $\text{Ni}^{2+}$ , se detectó inducción de autofagia a partir de una concentración de 50  $\mu\text{M}$ , que aumentaba proporcionalmente al aumentar la concentración de metal hasta 150  $\mu\text{M}$ , que es la concentración que induce la autofagia más fuertemente. Previamente, se ha demostrado que estas concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  afectan a la viabilidad celular de *Chlamydomonas* (Zheng et al., 2013). Además, se observó una estrecha correlación entre la concentración de metal en el medio y la intensidad en la señal de inmunofluorescencia de *ATG8*, así como en el número de puntos por célula. En cambio,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  muestran efectos importantes sobre *ATG8* a una alta concentración, 150  $\mu\text{M}$  en ambos casos.

Además, se ha demostrado que la inducción de autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$  es independiente del factor de transcripción *CRR1*. Este factor regula la expresión de genes de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (Sommer et al., 2010), por lo que se estudió su posible implicación en la inducción de genes de autofagia en respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$ . Para ello, se empleó el mutante *crr1* de *Chlamydomonas*, que presenta una mutación que impide la expresión de dicho factor de transcripción (Eriksson et al., 2004; Quinn et al., 2003). Nuestros resultados demuestran que el  $\text{Ni}^{2+}$  induce transcripcionalmente el gen *ATG8* en el mutante *crr1*, que además presenta un nivel basal de mRNA para este gen mayor que la estirpe silvestre. También se observó un aumento en los niveles de proteína *ATG8* y de su forma lipidada en el mutante *crr1* en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ , aunque esta acumulación ocurre antes en el mutante *crr1* que en la estirpe silvestre.

La inducción de autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$  no parece que ocurra vía estrés en el retículo endoplasmático, ya que la presencia de altas concentraciones de este metal no activa los marcadores de estrés en dicho orgánulo *ERO1* y *PDI6*. Por otra parte, con el fin de poder comparar la inducción de autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$  con la inducción por estrés en el retículo endoplasmático, se ha generado un mutante que expresa la proteína *ATG8* marcada con Estreptavidina (*SATG8*) bajo el promotor del gen del citocromo  $c_6$  (*CYC6*). Este promotor se induce en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  y se reprime en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  (Sommer et al., 2010). Nuestros resultados demuestran que el  $\text{Ni}^{2+}$  y el DTT, pero no la tunicamicina, inducen tanto la transcripción como la expresión de *SATG8* en estas células. Además, se ha demostrado que el DTT activa la expresión del gen *CYC6* en *Chlamydomonas*, lo que indica que el DTT no actúa únicamente en el retículo

endoplasmático sino que causa daños celulares en distintos compartimentos, como cabe esperar de un compuesto que reduce puentes disulfuro de forma inespecífica.

No obstante, se ha demostrado que no todos los metales inducen la autofagia. En esta Tesis se ha comprobado que el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Hg}^{2+}$  no son capaces de activar dicho proceso degradativo en *Chlamydomonas*. Estos metales no generan ningún efecto sobre el marcador de autofagia ATG8: no inducen el gen transcripcionalmente y no aumentan los niveles de proteína, ni se observan cambios en su distribución celular. A pesar de ser metales sumamente tóxicos que sí inducen la autofagia en organismos no fotosintéticos (Son et al., 2011; Vergilio et al., 2015), nuestros resultados indican que el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Hg}^{2+}$  no activan dicho proceso en *Chlamydomonas*.

### 5.5 El exceso de $\text{Ni}^{2+}$ induce estrés oxidativo en *Chlamydomonas*.

Los experimentos llevados a cabo en esta Tesis indican que elevadas concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  generan estrés oxidativo en *Chlamydomonas*. La presencia de este metal en el medio induce fuertemente la transcripción de los marcadores de estrés oxidativo *GSTS1* y *GPXH*, lo que sugiere que las células de *Chlamydomonas* tratadas con  $\text{Ni}^{2+}$  sufren estrés oxidativo.

Por otra parte, se ha realizado un análisis transcriptómico de células tratadas con una concentración moderada (50  $\mu\text{M}$ ) de  $\text{Ni}^{2+}$ , con objeto de determinar la respuesta primaria de las células a dicho metal. Para ello, y teniendo en cuenta que la inducción de autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$  es independiente de CRR1, se ha analizado el transcriptoma del mutante *crr1* y de la estirpe complementada en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ . Se han identificado 336 genes cuyos transcritos se inducen en ambas estirpes. De ellos, 275 genes no presentan una expresión significativamente distinta entre las dos estirpes, por lo que se considera este conjunto de genes como el transcriptoma de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  independiente de CRR1.

Dentro de este subtranscriptoma, el 25% de los transcritos sobre-expresados corresponden a genes relacionados con vías degradativas. Entre ellos, se encuentran los genes de autofagia *ATG3* y *ATG8*, lo que confirma que el exceso de  $\text{Ni}^{2+}$  tiene un efecto positivo sobre el proceso de autofagia. Además de estos genes *ATG*, en este grupo también aparecen genes que codifican para subunidades del proteasoma, proteasas y genes asociados a degradación dependiente de ubiquitina. Por otro lado, se ha comparado el transcriptoma de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  con el de respuesta a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se ha encontrado que ambos transcriptomas comparten un 80% de los genes sobre-expresados, reforzando de esta forma la hipótesis de que el  $\text{Ni}^{2+}$  causa estrés oxidativo en *Chlamydomonas*.

Finalmente, para estudiar en más detalle el efecto del  $\text{Ni}^{2+}$  en *Chlamydomonas*, también se ha comparado el transcriptoma de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  con el de respuesta a

otras condiciones de estrés: eliminación de la proteasa del cloroplasto ClpP1, tratamiento con rapamicina, tratamiento con rosa bengal que induce la formación de oxígeno singlete, anoxia en oscuridad, y carencia de  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ . El transcriptoma de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  presenta un solapamiento más significativo con los transcriptomas de respuesta a rapamicina o delección de ClpP1, condiciones que han sido demostradas anteriormente como inductoras de autofagia en *Chlamydomonas* (Perez-Perez et al., 2010; Ramundo et al., 2014).

## **5.6 El estrés oxidativo participa como inductor de la autofagia en respuesta a la toxicidad generada por $\text{Ni}^{2+}$ .**

En la presente Tesis se ha demostrado que el efecto del  $\text{Ni}^{2+}$  en la regulación de la autofagia en *Chlamydomonas* es debida en parte al estrés oxidativo que se genera como consecuencia de los altos niveles de dicho metal.

Con objeto de investigar si el estrés oxidativo juega algún papel en la regulación de la autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$ , se trataron células de *Chlamydomonas* con  $\text{Ni}^{2+}$  y el antioxidante N-acetil cisteína (NAC) simultáneamente. Los resultados obtenidos indicaron que la presencia de NAC impidió la inducción de *GSTS1* por  $\text{Ni}^{2+}$ , como cabe esperar por las propiedades antioxidantes de la NAC. Además, y de forma proporcional, se observó una disminución en el efecto del  $\text{Ni}^{2+}$  sobre ATG8, tanto a nivel transcripcional como de proteína. Es decir, la reducción de estrés oxidativo hace que disminuya la inducción de autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$ , lo que demuestra que el estrés oxidativo está implicado en la regulación de la autofagia en respuesta a este metal.



## 6 DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se demuestra que el estrés oxidativo, provocado por estreses tan distintos como el estrés en el retículo endoplasmático o la toxicidad inducida por metales pesados, participa en la inducción de autofagia en *Chlamydomonas*. Se ha demostrado en distintos modelos que el estrés oxidativo es un regulador positivo de la autofagia (Malaviya et al., 2014; Moore, 2014; Perez-Perez et al., 2012; Xiong et al., 2007). Sin embargo, los mecanismos que controlan la autofagia en respuesta a este tipo de estrés son en la actualidad poco conocidos. A continuación se discuten los resultados obtenidos en la presente Tesis, que sugieren una conexión entre ROS y autofagia en organismos fotosintéticos.

### 6.1 Inducción de autofagia por estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*.

En la presente Tesis se ha identificado un marcador de estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*: *CAL2* (Calreticulina-2), que se sobre-expresa al tratar las células con los agentes inductores de estrés en el retículo endoplasmático tunicamicina, DTT y tapsigargina. Este gen codifica para una chaperona del retículo endoplasmático (Nomura et al., 2011) que participa en la regulación de la homeostasis del  $Ca^{2+}$ , y que se encuentra altamente conservada en organismos eucariotas (Qiu et al., 2012). Los resultados obtenidos demuestran que el gen *CAL2* se encuentra también conservado en microalgas y que puede utilizarse como marcador de estrés en el retículo endoplasmático.

El estrés en el retículo endoplasmático induce la autofagia, desde levaduras (Yorimitsu et al., 2006) hasta mamíferos (Ogata et al., 2006) y plantas (Pu and Bassham, 2013). Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que el estrés en el retículo endoplasmático, generado por distintos agentes, también provoca una activación de la autofagia en *Chlamydomonas*. Tanto la tunicamicina, como el DTT y la tapsigargina inducen la transcripción del gen *ATG8*, la acumulación de proteína ATG8 y la aparición de sus formas lipidadas, lo cual indica que la autofagia se encuentra activa.

La autofagia forma parte de la respuesta a estrés en el retículo endoplasmático en células eucariotas (Ding et al., 2007; Liu and Bassham, 2013). En mamíferos, se ha demostrado que la autofagia juega un papel importante en la supervivencia celular ante estrés en el retículo endoplasmático (Ogata et al., 2006). Se considera que una de las principales funciones de la autofagia es contrarrestar la expansión que sufre el retículo endoplasmático durante la UPR (Unfolded Protein Response) (Bernales et al., 2006). Además, la autofagia también participa en la degradación de proteínas no

plegadas correctamente que se acumulan en el retículo endoplasmático (Ishida et al., 2009).

## **6.2 Inducción de estrés oxidativo por estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*.**

El estrés en el retículo endoplasmático se encuentra íntimamente ligado al estrés oxidativo. De hecho, un estudio realizado en plantas demuestra que el estrés en el retículo endoplasmático induce la producción de ROS, regula la respuesta antioxidante y cambia el estado redox de las plantas (Ozgur et al., 2014). Es posible que la autofagia participe en la eliminación del estrés oxidativo que se genera como consecuencia del estrés en el propio retículo endoplasmático.

Los resultados de esta Tesis confirman que el estrés en el retículo endoplasmático provoca estrés oxidativo en *Chlamydomonas*, ya que tanto la tunicamicina como el DTT inducen la transcripción de los marcadores de estrés oxidativo *GSTS1* y *GPXH*. Además, la tunicamicina provoca una disminución de los niveles celulares de GSH (glutación reducido) y un aumento de los niveles de GSSG (glutación oxidado), lo que indica que las células están sometidas a estrés oxidativo.

El plegamiento proteico dentro del retículo endoplasmático es posible gracias al ambiente altamente oxidante que existe dentro de dicho orgánulo (Tu and Weissman, 2004). Además, el propio plegamiento proteico genera estrés oxidativo en las células ya que la formación de los puentes disulfuro provoca la síntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de ERO1 (Delaunay-Moisan and Appenzeller-Herzog, 2015).

Como ya se ha explicado en la Introducción, la enzima PDI se encarga de catalizar la formación de los puentes disulfuro reduciéndose a sí misma (Benham et al., 2013). Por ello, necesita regenerar su forma oxidada para poder mantener su actividad. ERO1 oxida a PDI, transfiriendo los electrones al oxígeno y generando por tanto H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Ozgur et al., 2014; Tu and Weissman, 2004). Además de esto, ERO1 cataliza la formación de GSSG dentro del retículo endoplasmático (Appenzeller-Herzog, 2011), lo que reduce el ratio GSH/GSSG. Así, la proteína ERO1 contribuye a mantener el ambiente oxidante necesario para el plegamiento proteico del retículo endoplasmático (Haynes et al., 2004; Pagani et al., 2000).

Los genes tanto de *ERO1* como de *PDI* se encuentran muy conservados entre especies (Aller and Meyer, 2013; Filonova et al., 2013; Lemaire and Miginiac-Maslow, 2004; Onda and Kobori, 2014). En esta Tesis, se han identificado en *Chlamydomonas* el gen *ERO1* y dos genes *PDI*: *Rb60* y *PDI6*. *Rb60* es una PDI atípica con una localización dual: cloroplasto y retículo endoplasmático (Levitan et al., 2005). Dentro del cloroplasto forma parte de un complejo que regula la traducción (Danon and Mayfield, 1991), mientras que en el retículo endoplasmático probablemente actúa como otras PDI. La

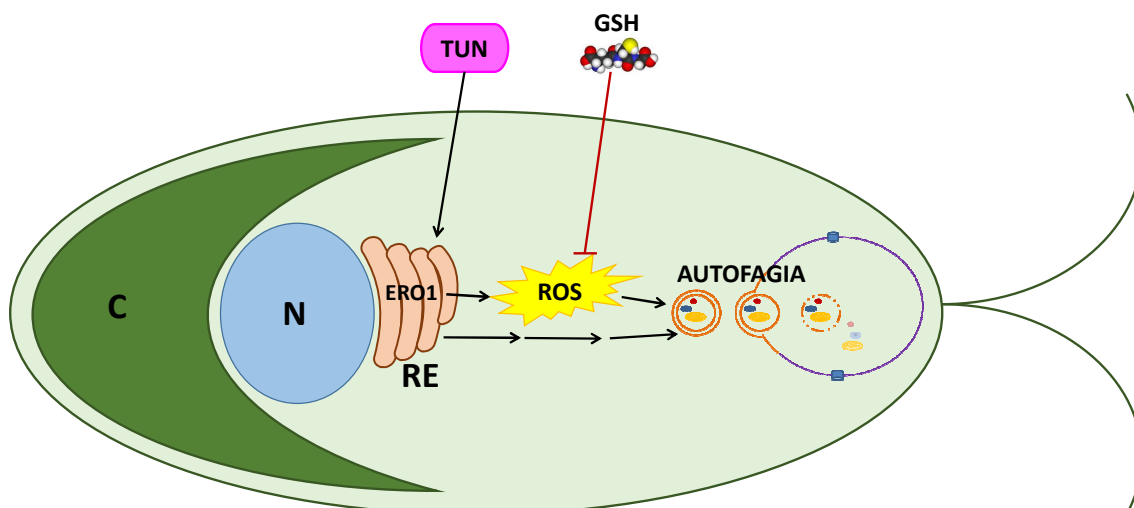
presencia de estos genes en *Chlamydomonas* demuestra que los mecanismos de plegamiento proteico descritos en otros organismos se encuentran conservados en microalgas.

Los genes *ERO1* y *PDI* se inducen durante la respuesta UPR (Pagani et al., 2000), para responder a la demanda de plegamiento proteico. En esta Tesis se ha demostrado que el estrés en el retículo endoplasmático provocado por tunicamicina, DTT o tapsigargina induce los genes *ERO1*, *Rb60* y *PDI6* de *Chlamydomonas*. Esto sugiere que el funcionamiento de la respuesta UPR se encuentra conservado en microalgas. Además, demuestra que estos genes también pueden utilizarse como marcadores de estrés en el retículo endoplasmático.

Por otro lado, la inducción de *ERO1*, *Rb60* y *PDI6* es un indicativo adicional de que se está generando estrés oxidativo en la célula, ya que se sabe que estas proteínas contribuyen a generar ROS en situaciones de estrés en el retículo endoplasmático (Haynes et al., 2004). No obstante, no puede descartarse que haya otras fuentes de ROS en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático, como las mitocondrias (Scherz-Shouval and Elazar, 2007, 2011) o las NADPH oxidasas (Sciarretta et al., 2015).

### **6.3 Estrés oxidativo como inductor de autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático.**

En esta Tesis, se ha demostrado que el antioxidante GSH disminuye la activación de la autofagia en células de *Chlamydomonas* sometidas a estrés en el retículo endoplasmático. El GSH disminuye tanto la transcripción como la cantidad de proteína ATG8, aunque se mantienen los niveles de estrés en el retículo endoplasmático, ya que la transcripción de marcadores de estrés en dicho orgánulo no disminuye. La adición de GSH debe restaurar el ratio GSH/GSSG y, por tanto, aliviar el estrés oxidativo. Estos resultados indican que la activación de autofagia en respuesta a estrés en el retículo depende en parte de ROS.



**Figura 19:** Inducción de autofagia por estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*. C: cloroplasto, N: núcleo, RE: retículo endoplasmático, TUN: tunicamicina.

Además, el GSH reduce la toxicidad de la tunicamicina, ya que aumenta la viabilidad celular y disminuye la expresión del gen *DAD1*. El gen *DAD1* es un gen putativo antiapoptótico conservado en eucariotas desde humanos (Kelleher and Gilmore, 1997; Nakashima et al., 1993) y levaduras (Kelleher and Gilmore, 1994) hasta plantas (Gallois et al., 1997) y algas (Moharikar et al., 2007), cuya proteína forma parte del complejo que cataliza la N-glicosilación en el retículo endoplasmático (Kelleher and Gilmore, 1997; Moharikar et al., 2007). Se cree que la proteína DAD1 está involucrada en prevenir la muerte celular (DAD1: Defender Against Death 1), hipótesis que cuadra con los resultados obtenidos en esta tesis. La tunicamicina induce la expresión de *DAD1*, ya que la toxicidad inducida por dicha droga compromete la viabilidad celular y las células deben activar distintos mecanismos de defensa para sobrevivir. Cuando además se añade GSH, disminuye significativamente la expresión de *DAD1*, debido a que el GSH reduce la toxicidad de la tunicamicina al aliviar el estrés oxidativo, por lo que la viabilidad de las células no se encuentra tan comprometida.

Por otro lado, se ha comprobado que la tunicamicina induce la autofagia antes y más fuertemente en el mutante *sor1*. Este mutante es más resistente a estrés oxidativo, ya que tiene mutado un factor de transcripción de forma que presenta una expresión constitutiva elevada de genes de respuesta a estrés oxidativo (Fischer et al., 2012). Cuando se tratan células del mutante *sor1* con tunicamicina, aumenta tanto la expresión como la cantidad de proteína ATG8 con mayor magnitud que en la estirpe silvestre. Además, este aumento ocurre antes en el tiempo que en la estirpe silvestre.

Esto podría deberse a que la sobre-expresión de algunos genes de respuesta a estrés oxidativo, como *GSTS1* y *GPXH*, puede provocar una disminución en los niveles celulares de GSH. La disminución de GSH se encuentra asociada a inducción de autofagia, tanto en organismos fotosintéticos (como se ha comprobado en esta Tesis)

como en mamíferos (Mancilla et al., 2015). Estos resultados sugieren de nuevo que la autofagia inducida por estrés en el retículo endoplasmático se encuentra asociada a señalización redox en *Chlamydomonas*. No obstante, no debe olvidarse que el efecto del GSH puede no estar asociado a eliminación de ROS y que puede estar implicado en otras vías de señalización, por ejemplo en la glutationilación de proteínas específicas (Zaffagnini et al., 2012).

#### **6.4 Inducción de autofagia por metales pesados en *Chlamydomonas*.**

Se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de metales causa daños celulares, estrés oxidativo y autofagia en varios organismos (Chiarelli and Roccheri, 2012). No obstante, no se ha estudiado con anterioridad el efecto de los metales sobre la autofagia en organismos fotosintéticos. En la presente Tesis, se demuestra que ciertos metales son capaces de inducir la autofagia en *Chlamydomonas*.

En primer lugar, los resultados obtenidos demuestran que el exceso de  $\text{Ni}^{2+}$  (níquel) provoca un aumento en la expresión y en el nivel de proteína ATG8, así como aparición de las formas lipidadas de dicha proteína, síntomas que indican inducción de autofagia. En otro estudio se ha demostrado que concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  similares a las empleadas en esta Tesis tienen un efecto negativo sobre el crecimiento de *Chlamydomonas* (Zheng et al., 2013), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

Además, se comprueba la localización celular de ATG8 en células tratadas con  $\text{Ni}^{2+}$  mediante inmunofluorescencia, visualizándose la señal en distintos puntos dentro de las células, con un patrón similar al observado en células sujetas a distintos tipos de estrés que inducen la autofagia (como estrés en el retículo endoplasmático). No obstante, no puede asegurarse si los puntos observados, que contienen ATG8, corresponden a estructuras autofágicas o a vacuolas.

También se demuestra que el factor de transcripción CRR1 no es necesario para la inducción de autofagia por  $\text{Ni}^{2+}$ . CRR1 regula la expresión de genes de respuesta a deficiencia de  $\text{Cu}^{2+}$  o presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  en *Chlamydomonas* (Sommer et al., 2010). Este factor de transcripción no está implicado en la regulación de la autofagia en respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$ , ya que el mutante *crr1* es capaz de inducir la autofagia en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ .

De hecho, se ha comprobado que este mutante presenta unos niveles de mRNA de ATG8 mayores que la estirpe silvestre en condiciones normales de crecimiento, que aumentan aún más en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ , manteniendo siempre un nivel más alto que la estirpe silvestre. No obstante, este mayor nivel de mRNA no se traduce en un mayor nivel de proteína ATG8, aunque el mutante *crr1* induce la autofagia antes que la estirpe silvestre en respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$ . Probablemente, estos resultados se deben a que,

al ser un mutante de un factor de transcripción, se encuentra transcripcionalmente desregulado y esto puede afectar indirectamente a la autofagia.

Se realiza también un análisis transcriptómico global del mutante *crr1* y la estirpe complementada en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$ . Los resultados obtenidos confirman la expresión de genes *ATG* de forma independiente a *CRR1*, así como la inducción de genes que codifican para subunidades del proteasoma, proteasas y proteínas relacionadas con la ubiquitina. Estos resultados sugieren que el  $\text{Ni}^{2+}$  provoca un daño generalizado en las células y activa vías degradativas como la autofagia. En concordancia con esta hipótesis, se comprueba que el transcriptoma de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  presenta un alto nivel de solapamiento con el transcriptoma de respuesta a rapamicina y con el transcriptoma de eliminación de la proteasa del cloroplasto ClpP1, condiciones que inducen la autofagia (Perez-Perez et al., 2010; Ramundo et al., 2014).

Finalmente, se comprueba el efecto de otros metales sobre la activación de la autofagia en *Chlamydomonas*. Se demuestra que el  $\text{Cu}^{2+}$  (cobre) y el  $\text{Co}^{2+}$  (cobalto) inducen la autofagia, ya que aumentan los niveles de mRNA de *ATG8*, aumentan los niveles de dicha proteína y aparecen sus formas lipidadas, además de cambiar la distribución celular de *ATG8* formando un patrón similar al observado en condiciones que inducen la autofagia. En cambio, el  $\text{Cd}^{2+}$  (cadmio) y el  $\text{Hg}^{2+}$  (mercurio) no causan ningún efecto sobre *ATG8* en *Chlamydomonas* y, por tanto, no inducen la autofagia en dicha microalga.

Tanto el  $\text{Cu}^{2+}$  como el  $\text{Co}^{2+}$  ya habían demostrado inducir la autofagia en mamíferos (Gallo et al., 2014; Trejo-Solís et al., 2012), pero hasta ahora no se había comprobado su efecto sobre la autofagia en organismos fotosintéticos. Los resultados obtenidos en esta Tesis demuestran que el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Co}^{2+}$  son capaces de inducir fuertemente la autofagia en microalgas. Por tanto, la autofagia puede actuar como un mecanismo de defensa celular ante la toxicidad generada por ciertos metales pesados.

Por otro lado, el  $\text{Cd}^{2+}$  ha demostrado inducir la autofagia en mamíferos (Son et al., 2011; Wang et al., 2013; Wang et al., 2009) y erizos de mar (Chiarelli and Roccheri, 2012), mientras que el  $\text{Hg}^{2+}$  ha demostrado recientemente hacerlo en humanos (Vergilio et al., 2015). Contrariamente a lo observado en organismos no fotosintéticos, estos metales no inducen la autofagia en *Chlamydomonas*, ni siquiera a altas concentraciones (150 y 2  $\mu\text{M}$  respectivamente), a pesar de ser altamente tóxicos. En organismos fotosintéticos únicamente se ha demostrado que el  $\text{Cd}^{2+}$  promueve la formación de estructuras vacuolares en la microalga *Micrasterias denticulata*, pero ese estudio no analiza ningún marcador específico de autofagia (Andosch et al., 2012).

Por tanto, la toxicidad provocada por  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  parece no inducir la autofagia en organismos fotosintéticos, al menos en las condiciones ensayadas en esta Tesis. Cabe la posibilidad de que estos metales induzcan la autofagia tan débilmente que los métodos utilizados en esta Tesis no permitan detectarlo. Otra posibilidad es que estos metales activen algún tipo de autofagia que no requiera de *ATG8*, como la microautofagia o la autofagia mediada por chaperonas.

## 6.5 Inducción de estrés oxidativo por metales pesados en *Chlamydomonas*.

Se conoce que el  $\text{Ni}^{2+}$  genera estrés oxidativo en distintos organismos, desde plantas (Ivanishchev and Abramova, 2015) y peces (Defo et al., 2014; Zheng et al., 2014) hasta mamíferos (El-Habit and Abdel Moneim, 2014; Xu et al., 2015), en la presente Tesis se estudia si esto también sucede en microalgas. Se comprueba que existe un gran solapamiento (80%) entre el transcriptoma de respuesta a  $\text{Ni}^{2+}$  y el de respuesta a  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que ha demostrado inducir estrés oxidativo y autofagia en *Chlamydomonas* (Perez-Perez et al., 2010). Se demuestra también que el  $\text{Ni}^{2+}$  provoca la inducción de los marcadores de estrés oxidativo *GSTS1* y *GPXH*. Por tanto, los resultados sugieren fuertemente que el  $\text{Ni}^{2+}$  genera estrés oxidativo en microalgas.

El  $\text{Cu}^{2+}$  provoca estrés oxidativo en mamíferos (Trejo-Solís et al., 2012) mientras que el  $\text{Co}^{2+}$  ha demostrado hacerlo en peces (Kubrak et al., 2011). En esta Tesis se ha demostrado que estos metales inducen la autofagia en *Chlamydomonas* y, aunque no se ha comprobado, es muy probable que también induzcan estrés oxidativo como hacen en otros modelos.

Por otro lado, distintos estudios demuestran cómo parte de la toxicidad inducida por  $\text{Cd}^{2+}$  está provocada por estrés oxidativo en mamíferos (El-Habit and Abdel Moneim, 2014; Nasiadek et al., 2014; Son et al., 2011; Wang et al., 2009), en peces (Defo et al., 2014) y en erizos de mar (Chiarelli and Roccheri, 2012). En hepatocitos de rata, el antioxidante NAC alivia el estrés oxidativo provocado por  $\text{Cd}^{2+}$  y aumenta la viabilidad celular (Wang et al., 2014), lo que sugiere que el estrés oxidativo juega un papel importante en la toxicidad inducida por este metal.

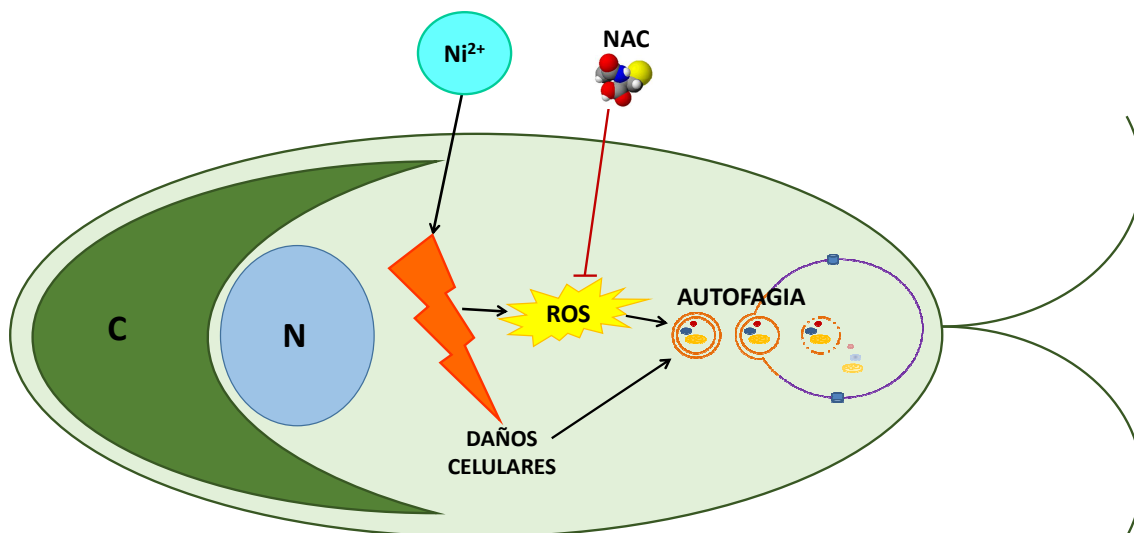
Finalmente, el  $\text{Hg}^{2+}$  es un elemento extremadamente tóxico que ha demostrado inducir estrés oxidativo de forma dosis dependiente en plantas (Sahu et al., 2012). Se cree que el  $\text{Hg}^{2+}$  causa estrés oxidativo atacando a moléculas antioxidantes con grupos  $-\text{SH}$ , como el GSH (Farina et al., 2013), por lo que probablemente cause estrés oxidativo en todas las especies.

Por tanto, es muy probable que el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Hg}^{2+}$  provoquen también estrés oxidativo en microalgas, además de otros daños celulares. No obstante, los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral muestran que estos metales no inducen la autofagia en *Chlamydomonas*.

## 6.6 Estrés oxidativo como inductor de autofagia en respuesta a metales pesados.

En adición a las evidencias que indican que existe una conexión entre inducción de autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático y señalización redox, los resultados de esta Tesis sugieren que también existe dicha conexión en respuesta a

toxicidad inducida por metales pesados. En concreto, se ha demostrado que el  $\text{Ni}^{2+}$  provoca estrés oxidativo en *Chlamydomonas*, y que la supresión de dicho estrés oxidativo con el antioxidante NAC reduce la inducción de autofagia. Por tanto, puede concluirse que el estrés oxidativo participa en la inducción de autofagia en respuesta a exceso de  $\text{Ni}^{2+}$  en microalgas.



**Figura 20:** Inducción de autofagia por exceso de  $\text{Ni}^{2+}$  en *Chlamydomonas*. C: cloroplasto, N: núcleo.

Estos resultados conducen a la hipótesis de que el estrés oxidativo está implicado en la inducción de autofagia en respuesta a metales pesados. Serían necesarias más evidencias experimentales para confirmar esta hipótesis, aunque los resultados obtenidos en la presente Tesis junto con los resultados obtenidos en estudios realizados en otros organismos así lo sugieren.

El  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Co}^{2+}$  también inducen la autofagia en *Chlamydomonas*, y muy probablemente provoquen estrés oxidativo como han demostrado hacer en otros organismos. Un estudio realizado en células humanas cancerígenas muestra que el  $\text{Cu}^{2+}$  induce la autofagia vía ROS provocando muerte celular, y que el antioxidante NAC reduce la autofagia provocada por el metal (Guo et al., 2010), de forma similar a lo observado en esta Tesis con  $\text{Ni}^{2+}$ . En mamíferos, se ha demostrado que el  $\text{Cu}^{2+}$  induce la autofagia por estrés oxidativo y que la autofagia favorece la muerte celular (Trejo-Solís et al., 2012). En otro estudio más reciente, se demuestra que el estrés oxidativo inducido por  $\text{Cu}^{2+}$  regula la autofagia transcripcionalmente (Zhong et al., 2014). Además, el  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Co}^{2+}$  también han demostrado inducir estrés oxidativo en plantas (Ravet and Pilon, 2013) y algas (Jamers et al., 2006; Merchant et al., 2006; Tan et al., 2010), por lo que es probable que la inducción de autofagia por estos metales esté mediada vía ROS.

En cambio, el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Hg}^{2+}$  no inducen la autofagia en *Chlamydomonas*, a pesar de provocar estrés oxidativo e inducir la autofagia en organismos no fotosintéticos. Por



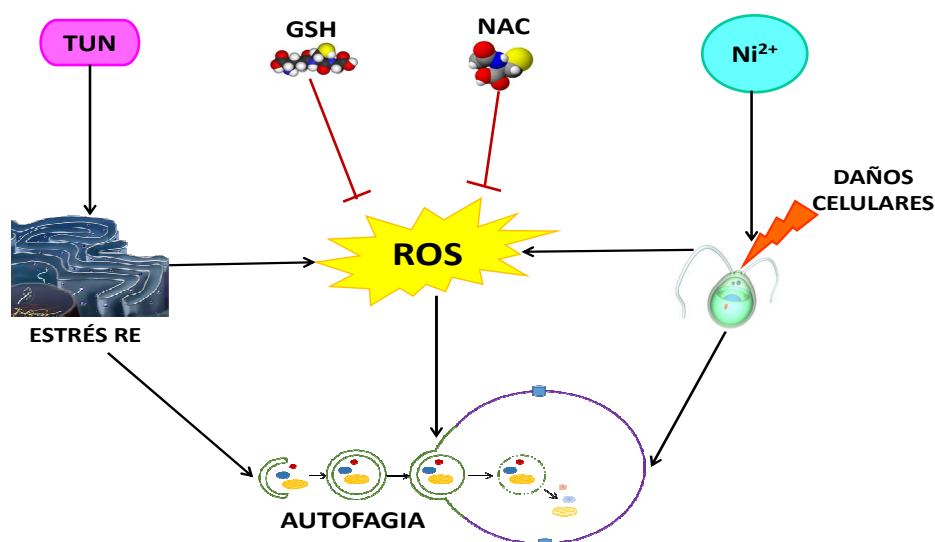
ejemplo, el antioxidante NAC alivia el estrés oxidativo provocado por  $\text{Cd}^{2+}$  en hepatocitos de rata y aumenta la viabilidad celular (Wang et al., 2014). El  $\text{Cd}^{2+}$  ha demostrado inducir la autofagia vía ROS en mamíferos (Luo et al., 2013; Son et al., 2011; Wang et al., 2009), aunque dependiendo de la línea celular la autofagia actúa promoviendo la muerte celular (Wang et al., 2008) o bien aumentando la viabilidad (Luo et al., 2013). En células epidérmicas, el  $\text{Cd}^{2+}$  inhibe a mTOR además de causar estrés oxidativo, activando la autofagia por ambas vías (Son et al., 2011). La inhibición de TOR en *Chlamydomonas* provoca una activación de la autofagia (Perez-Perez et al., 2010), ya que el  $\text{Cd}^{2+}$  no induce la autofagia en esta microalga es poco probable que inhiba a TOR.

Por tanto, parece que el efecto de los metales en la inducción de la autofagia puede variar significativamente dependiendo del tipo celular. En concordancia con esto, los resultados de esta tesis muestran que el  $\text{Cd}^{2+}$  y el  $\text{Hg}^2$  no inducen la autofagia en organismos fotosintéticos mientras sí lo hacen de distintas formas en otros organismos.

En conclusión, es posible que el estrés oxidativo provocado por ciertos metales participe en la inducción de autofagia, de forma similar a cómo lo hace el estrés oxidativo generado por estrés en el retículo endoplasmático. No obstante, no puede descartarse que los metales induzcan la autofagia por otras vías distintas al estrés oxidativo, como por ejemplo desplazando a otros metales de algunas metaloproteínas, lo que afecta a su actividad y puede inducir indirectamente la autofagia. De hecho, cabe destacar que muchas de las enzimas que participan en la eliminación de ROS en las células son metaloproteínas.

## **6.7 Conexión entre estrés oxidativo y activación de autofagia en *Chlamydomonas*.**

Como ya se ha explicado, tanto el estrés en el retículo endoplasmático como la toxicidad provocada por ciertos metales provocan activación de autofagia en *Chlamydomonas*, así como inducción de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral, sugieren fuertemente que existe una conexión entre este estrés oxidativo y activación de autofagia en microalgas.



**Figura 21:** Modelo de regulación de la autofagia en respuesta a estrés en el retículo endoplasmático y a exceso de  $\text{Ni}^{2+}$  en *Chlamydomonas*.

Esta conexión se había sugerido ya en otras especies, por ejemplo se ha comprobado que la supresión de la autofagia da como resultado estrés oxidativo constitutivo en plantas (Xiong et al., 2014). En mamíferos, varias evidencias apuntan a que las especies reactivas de oxígeno son esenciales en la regulación de la autofagia (Filomeni et al., 2015; Sciarretta et al., 2015; Scherz-Shouval and Elazar, 2011; Scherz-Shouval et al., 2007). De hecho, un estudio realizado en humanos demuestra que las especies reactivas de oxígeno regulan la actividad de la proteasa ATG4, oxidando una cisteína próxima a su centro catalítico (Scherz-Shouval et al., 2007).

En conclusión, los resultados obtenidos en la presente Tesis doctoral indican que la autofagia se encuentra regulada por vías de señalización redox en *Chlamydomonas*. Es decir, que las especies reactivas de oxígeno generadas por otros tipos de estrés pueden actuar como moléculas señalizadoras en la inducción de la autofagia. Se conoce que, a baja concentración, las especies reactivas de oxígeno actúan como señalizadoras, mientras que a altas concentraciones provocan estrés (Lee et al., 2012; Scherz-Shouval and Elazar, 2007, 2011). Además, se sabe que la autofagia se encuentra regulada al menos en parte por especies reactivas de oxígeno (Sciarretta et al., 2015), como ya se ha explicado anteriormente.

En concreto, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  funciona como molécula señalizadora y se ha demostrado que el retículo endoplasmático lo produce de forma constitutiva debido al plegamiento proteico (Delaunay-Moisand and Appenzeller-Herzog, 2015), por lo que es fácil pensar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  actúe como señalizadora para inducir la autofagia. No puede descartarse que otras especies reactivas de oxígeno actúen como señalizadoras, aunque el  $\text{H}_2\text{O}_2$  es una de las más estables. Tampoco puede descartarse que distintas fuentes de especies reactivas de oxígeno celulares, además del retículo endoplasmático, participen en la inducción de autofagia en respuesta a estrés.

## 7 CONCLUSIONES

- 7.1 El estrés en el retículo endoplasmático induce estrés oxidativo y activa la autofagia, formando este proceso degradativo parte de la respuesta a estrés en el retículo en *Chlamydomonas*.
- 7.2 Los genes PDI6, Rb60, ERO1 y CAL2 pueden ser empleados como marcadores específicos de estrés en el retículo endoplasmático en *Chlamydomonas*.
- 7.3 El estrés oxidativo generado como consecuencia de un estrés en el retículo endoplasmático participa en la inducción de la autofagia en respuesta a este daño celular aunque no es el único responsable de la activación de este proceso degradativo.
- 7.4 Concentraciones elevadas de  $\text{Ni}^{2+}$  en el medio de cultivo provocan un daño celular, generan estrés oxidativo, e inducen autofagia en *Chlamydomonas* de forma independiente al factor de transcripción CRR1.
- 7.5 El  $\text{Cu}^{2+}$  y el  $\text{Co}^{2+}$  inducen autofagia en *Chlamydomonas*, al contrario de lo que ocurre con  $\text{Cd}^{2+}$  o  $\text{Hg}^{2+}$ , al menos en las condiciones experimentales ensayadas en esta Tesis.
- 7.6 La formación de ROS en respuesta a concentraciones elevadas de  $\text{Ni}^{2+}$  en el medio de cultivo activa la autofagia en *Chlamydomonas*.

## 8 BIBLIOGRAFÍA

Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., et al. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology* 52, 399-451.

Aguilera, A., and Amils, R. (2005). Tolerance to cadmium in *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta) strains isolated from an extreme acidic environment, the Tinto River (SW, Spain). *Aquatic Toxicology* 75, 316-329.

Aller, I., and Meyer, A.J. (2013). The oxidative protein folding machinery in plant cells. *Protoplasma* 250, 799-816.

Alvarez, C., Garcia, I., Moreno, I., Perez-Perez, M.E., Crespo, J.L., Romero, L.C., and Gotor, C. (2012). Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 24, 4621-4634.

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106.

Anderson, G., Veit, B., and Hanson, M. (2005). The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology* 3, 12.

Andosch, A., Affenzeller, M.J., Lutz, C., and Lutz-Meindl, U. (2012). A freshwater green alga under cadmium stress: ameliorating calcium effects on ultrastructure and photosynthesis in the unicellular model *Micrasterias*. *J Plant Physiol* 169, 1489-1500.

Appenzeller-Herzog, C. (2011). Glutathione- and non-glutathione-based oxidant control in the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science* 124, 847-855.

Ashford, T.P., and Porter, K.R. (1962). Cytoplasmic Components In Hepatic Cell Lysosomes. *J Cell Biol.* 12, 198–202.

Avalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S., and Quest, A.F. (2014). Tumor suppression and promotion by autophagy. *BioMed research international* 2014, 603980.

Avila-Ospina, L., Moison, M., Yoshimoto, K., and Masclaux-Daubresse, C. (2014). Autophagy, plant senescence, and nutrient recycling. *Journal of experimental botany* 65, 3799-3811.

Avin-Wittenberg, T., and Fernie, A.R. (2014). At long last: evidence for pexophagy in plants. *Mol Plant* 7, 1257-1260.

Avin-Wittenberg, T., Honig, A., and Galili, G. (2012). Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 249, 285-299.

Badrick, A.C., and Jones, C.E. (2011). Reorganizing metals: the use of chelating compounds as potential therapies for metal-related neurodegenerative disease. *Current topics in medicinal chemistry* 11, 543-552.

Baehrecke, E.H. (2005). Autophagy: dual roles in life and death? *Nature reviews. Molecular cell biology* 6, 505-510.

Baldan, B., Girard-Bascou, J., Wolfman, F., and Olive, J. (1991). Evidence for Thylakoid Membrane Fusion during Zygote Formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology* 114, 905-915.

Baryla, A., Carrier, P., Franck, F., Coulomb, C., Sahut, C., and Havaux, M. (2001). Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. *Planta* 212, 696-709.

Bassham, D.C. (2007). Plant autophagy--more than a starvation response. *Current opinion in plant biology* 10, 587-593.

Bassham, D.C. (2009). Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1397-1403.

Bassham, D.C. (2014). Methods for analysis of autophagy in plants. *Methods*.

Bassham, D.C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L.J., and Yoshimoto, K. (2014). Autophagy in Development and Stress Responses of Plants. *Autophagy* 2, 2-11.

Beck, C.F., and Acker, A. (1992). Gametic Differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 98, 822-826.

Beg, M.U., Al-Jandal, N., Al-Subiai, S., Karam, Q., Husain, S., Butt, S.A., Ali, A., Al-Hasan, E., Al-Dufaileej, S., and Al-Husaini, M. (2015). Metallothionein, oxidative stress and trace metals in gills and liver of demersal and pelagic fish species from Kuwaits' marine area. *Marine pollution bulletin*.

Benham, A.M., van Lith, M., Sitia, R., and Braakman, I. (2013). Ero1-PDI interactions, the response to redox flux and the implications for disulfide bond formation in the mammalian endoplasmic reticulum. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368, 20110403.

Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Statist. Soc. B* 57, 289-300.

Berglund, A.H., Quartacci, M.F., Calucci, L., Navari-Izzo, F., Pinzino, C., and Liljenberg, C. (2002). Alterations of wheat root plasma membrane lipid composition induced by copper stress result in changed physicochemical properties of plasma membrane lipid vesicles. *Biochimica et biophysica acta* 1564, 466-472.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS biology* 4, e423.

Blaby-Haas, C.E., and Merchant, S.S. (2014). Lysosome-related organelles as mediators of metal homeostasis. *The Journal of biological chemistry* 289, 28129-28136.

Bogre, L., Okresz, L., Henriques, R., and Anthony, R.G. (2003). Growth signalling pathways in Arabidopsis and the AGC protein kinases. *Trends in plant science* 8, 424-431.

Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 72, 248-254.

Bronietzki, A.W., Schuster, M., and Schmitz, I. (2015). Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunology and cell biology* 93, 25-34.

Buléon, A., Gallant, D.J., Bouchet, B., Mouille, G., D'Hulst, C., Kossmann, J., and Ball, S. (1997). *Chlamydomonas reinhardtii* as a Model Microbial System to Investigate the Biosynthesis of the Plant Amylopectin Crystal. *Plant physiology* 115, 949-957.

Bullen, J.W., Balsbaugh, J.L., Chanda, D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Neumann, D., and Hart, G.W. (2014). Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *The Journal of biological chemistry* 289, 10592-10606.

Bundy, J.G., Kille, P., Liebeke, M., and Spurgeon, D.J. (2014). Metallothioneins may not be enough--the role of phytochelatins in invertebrate metal detoxification. *Environmental science & technology* 48, 885-886.

Carocci, A., Rovito, N., Sinicropi, M.S., and Genchi, G. (2014). Mercury toxicity and neurodegenerative effects. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 229, 1-18.

Cebollero, E., and Reggiori, F. (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1793, 1413-1421.

Cebollero, E., Reggiori, F., and Kraft, C. (2012). Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *International journal of cell biology* 2012, 182834.

Cecconi, F., and Levine, B. (2008). The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* 15, 344-357.

Chiarelli, R., and Roccheri, M.C. (2012). Heavy metals and metalloids as autophagy inducing agents: focus on cadmium and arsenic. *Cells* 1, 597-616.

Cianfanelli, V., De Zio, D., Di Bartolomeo, S., Nazio, F., Strappazon, F., and Cecconi, F. (2015). Ambra1 at a glance. *J Cell Sci* 128, 2003-2008.

Contento, A.L., Kim, S.J., and Bassham, D.C. (2004). Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to Suc starvation. *Plant physiology* 135, 2330-2347.

Contento, A.L., Xiong, Y., and Bassham, D.C. (2005). Visualization of autophagy in Arabidopsis using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42, 598-608.

Coss, R.A. (1974). Mitosis In *Chlamydomonas reinhardtii* Basal Bodies And The Mitotic Apparatus. *THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY* 63, 325-329.

Crespo, J.L., Diaz-Troya, S., and Florencio, F.J. (2005). Inhibition of Target of Rapamycin Signaling by Rapamycin in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 139, 1736–1749.

Crespo, J.L., and Hall, M.N. (2002). Elucidating TOR Signaling and Rapamycin Action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 579-591.

Chatterjee, S., Sarkar, S., and Bhattacharya, S. (2014). Toxic metals and autophagy. *Chemical research in toxicology* 27, 1887-1900.

Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., and Ravanan, P. (2014). A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in cellular neuroscience* 8, 213.

Chen, J., and Yang, Z.M. (2012). Mercury toxicity, molecular response and tolerance in higher plants. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 25, 847-857.

Chen, X., and Yin, X.M. (2011). Coordination of autophagy and the proteasome in resolving endoplasmic reticulum stress. *Veterinary pathology* 48, 245-253.

Chen, Y., Azad, M.B., and Gibson, S.B. (2009). Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. *Cell death and differentiation* 16, 1040-1052.

Chen, Y., and Klionsky, D.J. (2011). The regulation of autophagy – unanswered questions. *Journal of Cell Science* 124, 161-170.

Cherra, S.J., 3rd, Kulich, S.M., Uechi, G., Balasubramani, M., Mountzouris, J., Day, B.W., and Chu, C.T. (2010). Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *The Journal of cell biology* 190, 533-539.

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25, 294-306.

Chung, T., Suttangkakul, A., and Vierstra, R.D. (2009). The ATG autophagic conjugation system in maize: ATG transcripts and abundance of the ATG8-lipid adduct are regulated by development and nutrient availability. *Plant physiology* 149, 220-234.

Danon, A., and Mayfield, S.P. (1991). Light regulated translational activators: identification of chloroplast gene specific mRNA binding proteins. *Embo j* 10, 3993-4001.

Debuchy, R., Purton, S., and Rochaix, J.-D. (1989). The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *The EMBO Journal* 8, 2803-2809.

Deegan, S., Koryga, I., Glynn, S.A., Gupta, S., Gorman, A.M., and Samali, A. (2015). A close connection between the PERK and IRE arms of the UPR and the transcriptional regulation of autophagy. *Biochemical and biophysical research communications* 456, 305-311.

Defo, M.A., Bernatchez, L., Campbell, P.G., and Couture, P. (2014). Waterborne cadmium and nickel impact oxidative stress responses and retinoid metabolism in yellow perch. *Aquat Toxicol* 154, 207-220.

Delaunay-Moisan, A., and Appenzeller-Herzog, C. (2015). The antioxidant machinery of the endoplasmic reticulum: Protection and signaling. *Free Radic Biol Med*.

Deniaud, A., Sharaf el dein, O., Maillier, E., Poncet, D., Kroemer, G., Lemaire, C., and Brenner, C. (2008). Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* 27, 285-299.

Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaï, M., Bedu, M., Robaglia, C., and Meyer, C. (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Reports* 8, 864-870.

Devriesea, M., Tsakaloudib, V., Garbayoc, I., León, R., Vílchez, C., and Vígara, J. (2001). Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol. Biochem* 39, 443-448.

Díaz-Troya, S., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2008a). Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 7, 212-222.



Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2008b). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* 4, 851-865.

Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.M. (2007). Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *The American journal of pathology* 171, 513-524.

Dobrenel, T., Marchive, C., Sormani, R., Moreau, M., Mozzo, M., Montane, M.H., Menand, B., Robaglia, C., and Meyer, C. (2011). Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochemical Society transactions* 39, 477-481.

Dodson, M., Darley-Usmar, V., and Zhang, J. (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: traffic control by redox signaling. *Free radical biology & medicine* 63, 207-221.

Domínguez, M.J., Gutiérrez, F., León, R., Vílchez, C., Vega, J.M., and Vígara, J. (2003). Cadmium increases the activity levels of glutamate dehydrogenase and cysteine synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 828-832.

Dunlop, E.A., and Tee, A.R. (2014). mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Seminars in cell & developmental biology* 36, 121-129.

Ebersold, W.T. (1967). *Chlamydomonas reinhardtii*: Heterozygous Diploid Strains. *Science* 157, 447-449.

Eisenberg, T., Schroeder, S., Andryushkova, A., Pendl, T., Kuttner, V., Bhukel, A., Marino, G., Pietrocola, F., Harger, A., Zimmermann, A., et al. (2014). Nucleocytoplasmic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme A stimulates autophagy and prolongs lifespan. *Cell metabolism* 19, 431-444.

El-Habit, O.H., and Abdel Moneim, A.E. (2014). Testing the genotoxicity, cytotoxicity, and oxidative stress of cadmium and nickel and their additive effect in male mice. *Biol Trace Elem Res* 159, 364-372.

Elbaz, A., Wei, Y.Y., Meng, Q., Zheng, Q., and Yang, Z.M. (2010). Mercury-induced oxidative stress and impact on antioxidant enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology* 19, 1285-1293.

Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., and Xie, Y. (2015). Heavy Metal Stress and Some Mechanisms of Plant Defense Response. *TheScientificWorldJournal* 2015, 756120.

- Eriksson, M., Gardestrom, P., and Samuelsson, G. (1995). Isolation, Purification, and Characterization of Mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 107, 479-483.
- Eriksson, M., Moseley, J.L., Tottey, S., Del Campo, J.A., Quinn, J., Kim, Y., and Merchant, S. (2004). Genetic dissection of nutritional copper signaling in *chlamydomonas* distinguishes regulatory and target genes. *Genetics* 168, 795-807.
- Falciatore, A., Merendino, L., Barneche, F., Ceol, M., Meskauskiene, R., Apel, K., and Rochaix, J.-D. (2005). The FLP proteins act as regulators of chlorophyll synthesis in response to light and plastid signals in *Chlamydomonas*. *GENES & DEVELOPMENT* 19, 176–187.
- Farina, M., Avila, D.S., da Rocha, J.B., and Aschner, M. (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochem Int* 62, 575-594.
- Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell research* 24, 24-41.
- Fernandez, E., Schnell, R., Ranum, L.P.W., Hussey, S.C., Silflow, C.D., and Lefebvre, P.A. (1989). Isolation and characterization of the nitrate reductase structural gene of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 6449-6453.
- Ferrante, P., Catalanotti, C., Bonente, G., and Giuliano, G. (2008). An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PloS one* 3, e3200.
- Ferris, P.J., Armbrust, V., and Goodenough, U.W. (2002). Genetic Structure of the Mating-Type Locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 160, 181-200.
- Filomeni, G., De Zio, D., and Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22, 377-388.
- Filonova, A., Haemsch, P., Gebauer, C., Weisheit, W., and Wagner, V. (2013). Protein disulfide isomerase 2 of *Chlamydomonas reinhardtii* is involved in circadian rhythm regulation. *Molecular plant* 6, 1503-1517.
- Fimia, G.M., and Piacentini, M. (2010). Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67, 1581-1588.
- Fischer, B.B., Dayer, R., Schwarzenbach, Y., Lemaire, S.D., Behra, R., Liedtke, A., and Eggen, R.I. (2009). Function and regulation of the glutathione peroxidase homologous gene GPXH/GPX5 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 71, 569-583.

Fischer, B.B., Ledford, H.K., Wakao, S., Huang, S.G., Casero, D., Pellegrini, M., Merchant, S.S., Koller, A., Eggen, R.I.L., and Niyogi, K.K. (2012). SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS, E1302–E1311.

Fischer, N., and Rochaix, J.-D. (2001). The flanking regions of *PsaD* drive efficient gene expression in the nucleus of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol Genet Genomics 265, 888-894.

Fischera, B.B., Ledforda, H.K., Wakaoa, S., Huang, S.G., Caseroc, D., Pellegrinic, M., Merchantd, S.S., Kollerb, A., Eggenb, R.I.L., and Niyogi, K.K. (2012). SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*. PNAS 109, E1302–E1311.

Floyd, B.E., Morriss, S.C., Macintosh, G.C., and Bassham, D.C. (2012). What to eat: evidence for selective autophagy in plants. Journal of integrative plant biology 54, 907-920.

Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J.H., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M.A., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J.D., et al. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422, 442-446.

Frand, A.R., and Kaiser, C.A. (1999). Ero1p oxidizes protein disulfide isomerase in a pathway for disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum. Molecular cell 4, 469-477.

Fullgrabe, J., Klionsky, D.J., and Joseph, B. (2014). The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. Nature reviews. Molecular cell biology 15, 65-74.

Fullgrabe, J., Lynch-Day, M.A., Heldring, N., Li, W., Struijk, R.B., Ma, Q., Hermanson, O., Rosenfeld, M.G., Klionsky, D.J., and Joseph, B. (2013). The histone H4 lysine 16 acetyltransferase hMOF regulates the outcome of autophagy. Nature 500, 468-471.

Furuta, N., and Amano, A. (2010). Cellular machinery to fuse antimicrobial autophagosome with lysosome. Communicative & Integrative Biology 3, 385-387.

Gallo, S., Gatti, S., Sala, V., Albano, R., Costelli, P., Casanova, E., Comoglio, P.M., and Crepaldi, T. (2014). Agonist antibodies activating the Met receptor protect cardiomyoblasts from cobalt chloride-induced apoptosis and autophagy. Cell Death Dis 5, e1185.

Gallois, P., Makishima, T., Hecht, V., Despres, B., Laudie, M., Nishimoto, T., and Cooke, R. (1997). An *Arabidopsis thaliana* cDNA complementing a hamster apoptosis suppressor mutant. Plant J 11, 1325-1331.

Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5, a013169.

Gargouri, M., Park, J.J., Holguin, F.O., Kim, M.J., Wang, H., Deshpande, R.R., Shachar-Hill, Y., Hicks, L.M., and Gang, D.R. (2015). Identification of regulatory network hubs that control lipid metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of experimental botany* 66, 4551-4566.

Ghiglione, H.O., Gonzalez, F.G., Serrago, R., Maldonado, S.B., Chilcott, C., Cura, J.A., Miralles, D.J., Zhu, T., and Casal, J.J. (2008). Autophagy regulated by day length determines the number of fertile florets in wheat. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 55, 1010-1024.

Glick, D., Barth, S., and Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* 221, 3-12.

Gong, J.S., and Kim, G.J. (2014). The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. *Clinical and experimental reproductive medicine* 41, 97-107.

Goodenough, U.W. (1992). Green Yeast. *Cell* 70, 533-538.

Guo, W.J., Ye, S.S., Cao, N., Huang, J., Gao, J., and Chen, Q.Y. (2010). ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. *Exp Toxicol Pathol* 62, 577-582.

Hanahan, D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Hanikenne, M. (2003). *Chlamydomonas reinhardtii* as a eukaryotic photosynthetic model for studies of heavy metal homeostasis and tolerance. *New Phytologist* 159, 331-340.

Harris, E.H. (2001). *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 363-406.

Harris, E.H., Stern, D.B., and Witman, G.B. (2008). *The Chlamydomonas Sourcebook* (Second Edition) (Academic Press).

Haynes, C.M., Titus, E.A., and Cooper, A.A. (2004). Degradation of misfolded proteins prevents ER-derived oxidative stress and cell death. *Molecular cell* 15, 767-776.

He, C., and Klionsky, D.J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* 43, 67-93.

Heath, M.C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant molecular biology* 44, 321-334.

Hegedus, K., Takats, S., Kovacs, A.L., and Juhasz, G. (2013). Evolutionarily conserved role and physiological relevance of a STX17/Syx17 (syntaxin 17)-containing SNARE complex in autophagosome fusion with endosomes and lysosomes. *Autophagy* 9, 1642-1646.

Henderson, P., and Stevens, C. (2012). The role of autophagy in Crohn's disease. *Cells* 1, 492-519.

Ho, S.-H., Nakanishi, A., Ye, X., Chang, J.-S., Hara, K., Hasunuma, T., and Kondo, A. (2014). Optimizing biodiesel production in marine *Chlamydomonas* sp. JSC4 through metabolic profiling and an innovative salinity-gradient strategy. *Biotechnology for Biofuels* 7.

Honig, A., Avin-Wittenberg, T., Ufaz, S., and Galili, G. (2012). A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. *The Plant cell* 24, 288-303.

Hori, H., and Elbein, A.D. (1981). Tunicamycin Inhibits Protein Glycosylation in Suspension Cultured Soybean Cells. *Plant Physiol.* 67, 882-886.

Horst, W.J., Wang, Y., and Eticha, D. (2010). The role of the root apoplast in aluminium-induced inhibition of root elongation and in aluminium resistance of plants: a review. *Annals of botany* 106, 185-197.

Horvath, B.M., Magyar, Z., Zhang, Y., Hamburger, A.W., Bako, L., Visser, R.G., Bachem, C.W., and Bögner, L. (2006). EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *Embo j* 25, 4909-4920.

Huang, B., Ramanis, Z., Dutcher, S.K., and Luck, D.J.L. (1982). Uniflagellar Mutants of *Chlamydomonas*: Evidence for the Role of Basal Bodies in Transmission of Positional Information. *Cell* 29, 745-753.

Hunnicut, G.R., Kosfisz, M.G., and Snell, W.J. (1990). Cell Body and Flagellar Agglutinins in *Chlamydomonas reinhardtii*: The Cell Body Plasma Membrane Is a Reservoir for Agglutinins whose Migration to the Flagella Is Regulated by a Functional Barrier. *The Journal of Cell Biology* 111, 1605-1616.

Ikeda, Y., Sciarretta, S., Nagarajan, N., Rubattu, S., Volpe, M., Frati, G., and Sadoshima, J. (2014). New insights into the role of mitochondrial dynamics and autophagy during oxidative stress and aging in the heart. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014, 210934.

Inoue, Y., and Klionsky, D.J. (2010). Regulation of macroautophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Seminars in cell & developmental biology* 21, 664-670.

Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., and Mae, T. (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an ATG gene-dependent autophagic process. *Plant physiology* 148, 142-155.

Ishida, Y., Yamamoto, A., Kitamura, A., Lamande, S.R., Yoshimori, T., Bateman, J.F., Kubota, H., and Nagata, K. (2009). Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. *Mol Biol Cell* 20, 2744-2754.

Ivanishchev, V.V., and Abramova, E.A. (2015). Accumulation of nickel ions in seedlings of *Vicia sativa* L. and manifestations of oxidative stress. *Environ Sci Pollut Res Int*.

Izumi, M., Hidema, J., and Ishida, H. (2013a). Deficiency of autophagy leads to significant changes of metabolic profiles in *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior* 8.

Izumi, M., Hidema, J., Makino, A., and Ishida, H. (2013b). Autophagy contributes to nighttime energy availability for growth in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 161, 1682-1693.

Jamers, A., Van der Ven, K., Moens, L., Robbens, J., Potters, G., Guisez, Y., Blust, R., and De Coen, W. (2006). Effect of copper exposure on gene expression profiles in *Chlamydomonas reinhardtii* based on microarray analysis. *Aquat Toxicol* 80, 249-260.

Jangamreddy, J.R., Panigrahi, S., and Los, M.J. (2014). Monitoring of autophagy is complicated-salinomycin as an example. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 604-610.

Jia, D., Jing-Li, Y., and Cheng-Hao, L. (2012). Advances in metallotionein studies in forest trees. *Plant Omics Journal* 5, 46-51.

Jiang, H., Cheng, D., Liu, W., Peng, J., and Feng, J. (2010). Protein kinase C inhibits autophagy and phosphorylates LC3. *Biochemical and biophysical research communications* 395, 471-476.

Jiang, Q., Zhao, L., Dai, J., and Wu, Q. (2012). Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. *PloS one* 7, e41826.

Jinkerson, R.E., and Jonikas, M.C. (2015). Molecular techniques to interrogate and edit the *Chlamydomonas* nuclear genome. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82, 393-412.

Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS letters* 584, 1287-1295.

Kagi, J.H., and Valee, B.L. (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *The Journal of biological chemistry* 235, 3460-3465.

Karpagam, R., Preeti, R., Ashokkumar, B., and Varalakshmi, P. (2015). Enhancement of lipid production and fatty acid profiling in *Chlamydomonas reinhardtii*, CC1010 for biodiesel production. *Ecotoxicol Environ Saf*.

Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* oligosaccharyltransferase is a protein complex composed of Wbp1p, Swp1p, and four additional polypeptides. *J Biol Chem* 269, 12908-12917.

Kelleher, D.J., and Gilmore, R. (1997). DAD1, the defender against apoptotic cell death, is a subunit of the mammalian oligosaccharyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4994-4999.

Kim, E.-J., and Cerutti, H. (2009). Chapter 5 - Targeted Gene Silencing by RNA Interference in *Chlamydomonas*. In *Methods in Cell Biology*, M.K. Stephen, and J.P. Gregory, eds. (Academic Press), pp. 99-110.

Kim, S., Lee, Y.-C., Cho, D.-H., Lee, H.U., Huh, Y.S., Kim, G.-J., and Kim, H.-S. (2014). A Simple and Non-Invasive Method for Nuclear Transformation of Intact-walled *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLOS ONE* 9.

Kim, S.H., Kwon, C., Lee, J.H., and Chung, T. (2012). Genes for plant autophagy: functions and interactions. *Molecules and cells* 34, 413-423.

Kimura, S., Fujita, N., Noda, T., and Yoshimori, T. (2009). Monitoring Autophagy in Mammalian Cultured Cells through the Dynamics of LC3. In *Methods in Enzymology*, pp. 1-12.

Kincaid, M.M., and Cooper, A.A. (2007). ERADicate ER stress or die trying. *Antioxidants & redox signaling* 9, 2373-2387.

Kindle, K.L. (1990). High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics* 87, 1228-1232.

Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fermindez, E., and Lefebvre, P.A. (1989). Stable Nuclear Transformation of *Chlamydomonas* Using the *Chlamydomonas* Gene for Nitrate Reductase. *The Journal of Cell Biology* 109, 2589-2601.

Klionsky, D.J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 931-937.

Klionsky, D.J. (2014). Citing recent declines in the discovery of new ATG genes, some scientists now suggest that the end of autophagy research may be within sight. *Autophagy* 10, 715-716.

Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 16, 151–175.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., William A. Dunn, J., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et al. (2003). A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Developmental Cell* 5, 539–545.

Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., and Seglen, P.O. (2014). Methods for Monitoring Autophagy from Yeast to Human. *Autophagy* 3, 181-206.

Klionsky, D.J., FC, A., H, A., RT, A., A, A.-A., Adeli K, A.L., M, A., P, A., JA, A.-G., HJ, A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544.

Knodler, L.A., and Celli, J. (2011). Eating the strangers within: host control of intracellular bacteria via xenophagy. *Cellular microbiology* 13, 1319-1327.

Koblenz, B., and Lechtreck, K.F. (2005). The NIT1 promoter allows inducible and reversible silencing of centrin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* 4, 1959-1962.

Kreimer, G. (2009). The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more? *Current genetics* 55, 19-43.

Kuang, E., Okumura, C.Y., Sheffy-Levin, S., Varsano, T., Shu, V.C., Qi, J., Niesman, I.R., Yang, H.J., Lopez-Otin, C., Yang, W.Y., et al. (2012). Regulation of ATG4B stability by RNF5 limits basal levels of autophagy and influences susceptibility to bacterial infection. *PLoS genetics* 8, e1003007.

Kubrak, O.I., Husak, V.V., Rovenko, B.M., Storey, J.M., Storey, K.B., and Lushchak, V.I. (2011). Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 85, 983-989.

Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585-596.

La Russa, M., Bogen, C., Uhmeyer, A., Doebbe, A., Filippone, E., Kruse, O., and Mussnug, J.H. (2012). Functional analysis of three type-2 DGAT homologue genes for triacylglycerol production in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of biotechnology* 162, 13-20.

Lamark, T., and Johansen, T. (2012). Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy. *International Journal of Cell Biology* 2012, 1-21.



Langford, N., and Ferner, R. (1999). Toxicity of mercury. *Journal of human hypertension* 13, 651-656.

Lazarou, M. (2015). Keeping the immune system in check: a role for mitophagy. *Immunology and cell biology* 93, 3-10.

Leavitt, R., Schlesinger, S., and Kornfeld, S. (1997). Tunicamycin Inhibits Glycosylation and Multiplication of Sindbis and Vesicular Stomatitis Viruses. *JOURNAL OF VIROLOGY* 21, 375-385.

Lee, H.N., Kim, J., and Chung, T. (2014). Degradation of plant peroxisomes by autophagy. *Frontiers in plant science* 5, 139.

Lee, J., Giordano, S., and Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical journal* 441, 523-540.

Lee, J.S., and Lee, G.M. (2012). Monitoring of autophagy in Chinese hamster ovary cells using flow cytometry. *Methods* 56, 375-382.

Lefebvre, P.A., and Silflow, C.D. (1999). *Chlamydomonas: The Cell and Its Genomes*. *Genetics* 151, 9-14.

Lemaire, S.D., and Miginiac-Maslow, M. (2004). The thioredoxin superfamily in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis research* 82, 203-220.

Lenz, H.D., Haller, E., Melzer, E., Kober, K., Wurster, K., Stahl, M., Bassham, D.C., Vierstra, R.D., Parker, J.E., Bautor, J., et al. (2011). Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 66, 818-830.

Levine, B., and Klionsky, D.J. (2004). Development by Self-Digestion: Molecular Mechanisms and Biological Functions of Autophagy. *Developmental Cell* 6, 463–477.

Levitan, A., Trebitsh, T., Kiss, V., Pereg, Y., Dangoor, I., and Danon, A. (2005). Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6225-6230.

Lherminier, J., Elmayan, T., Fromentin, J., Elaraqui, K.T., Vesa, S., Morel, J., Verrier, J.L., Cailleateau, B., Blein, J.P., and Simon-Plas, F. (2009). NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production: subcellular localization and reassessment of its role in plant defense. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 22, 868-881.

Li, F., Chung, T., and Vierstra, R.D. (2014). AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in Arabidopsis. *The Plant cell* 26, 788-807.

Li, F., and Vierstra, R.D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in plant science* 17, 526-537.

Li, W.C., and Tse, H.F. (2015). Health risk and significance of mercury in the environment. *Environmental science and pollution research international* 22, 192-201.

Li, W.W., Li, J., and Bao, J.K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 1125-1136.

Liu, Y., and Bassham, D.C. (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one* 5, e11883.

Liu, Y., and Bassham, D.C. (2012). Autophagy: pathways for self-eating in plant cells. *Annual review of plant biology* 63, 215-237.

Liu, Y., and Bassham, D.C. (2013). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy in plants. *Autophagy* 9, 622-623.

Liu, Y., Burgos, J.S., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S.H., and Bassham, D.C. (2012). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 24, 4635-4651.

Liu, Y., Xiong, Y., and Bassham, D.C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* 5, 954-963.

Lodish, H.F., and Kong, N. (1993). The Secretory Pathway Is Normal in Dithiothreitol-treated Cells, But Disulfide-bonded Proteins Are Reduced and Reversibly Retained in the Endoplasmic Reticulum. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 268, 20598-20605.

Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N. (2002). Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell* 10, 457-468.

Long, X., Muller, F., and Avruch, J. (2004). TOR action in mammalian cells and in *Caenorhabditis elegans*. *Current topics in microbiology and immunology* 279, 115-138.

Luo, Y.H., Wu, S.B., Wei, Y.H., Chen, Y.C., Tsai, M.H., Ho, C.C., Lin, S.Y., Yang, C.S., and Lin, P. (2013). Cadmium-based quantum dot induced autophagy formation for cell survival via oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 26, 662-673.

Lynch-Day, M.A., and Klionsky, D.J. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS letters* 584, 1359-1366.

Lytton, J., Westlin, M., and Hanley, M.R. (1991). Thapsigargin Inhibits the Sarcoplasmic or Endoplasmic Reticulum Ca-ATPase Family of Calcium Pumps. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 266, 17067-17071.

Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., and Verma, D.P.S. (2006). Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals. *The Plant cell* 18, 477-490.

Malaviya, R., Laskin, J.D., and Laskin, D.L. (2014). Oxidative stress-induced autophagy: role in pulmonary toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 275, 145-151.

Mao, K., Chew, L.H., Inoue-Aono, Y., Cheong, H., Nair, U., Popelka, H., Yip, C.K., and Klionsky, D.J. (2013). Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, E2875-2884.

Marchetti, C. (2013). Role of calcium channels in heavy metal toxicity. *ISRN toxicology* 2013, 184360.

Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014a). Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 81-94.

Marino, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S.A., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., et al. (2014b). Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Molecular cell* 53, 710-725.

Marsh, S.A., Powell, P.C., Dell'italia, L.J., and Chatham, J.C. (2013). Cardiac O-GlcNAcylation blunts autophagic signaling in the diabetic heart. *Life sciences* 92, 648-656.

Martinez, I.M. (2003). Genomic Analysis of the Unfolded Protein Response in Arabidopsis Shows Its Connection to Important Cellular Processes. *The Plant Cell Online* 15, 561-576.

Matsui, A., Kamada, Y., and Matsuura, A. (2013). The role of autophagy in genome stability through suppression of abnormal mitosis under starvation. *PLoS genetics* 9, e1003245.

Maul, J.E. (2002). The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats. *The Plant Cell Online* 14, 2659-2679.

Mayfield, S.P., Manuell, A.L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., and Marin-Navarro, J. (2007). *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Current opinion in biotechnology* 18, 126-133.

Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C. (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 6422-6427.

Merchant, S.S., Allen, M.D., Kropat, J., Moseley, J.L., Long, J.C., Tottey, S., and Terauchi, A.M. (2006). Between a rock and a hard place: trace element nutrition in *Chlamydomonas*. *Biochim Biophys Acta* 1763, 578-594.

Merchant, S.S., Kropat, J., Liu, B., Shaw, J., and Warakanont, J. (2012). TAG, you're it! *Chlamydomonas* as a reference organism for understanding algal triacylglycerol accumulation. *Current opinion in biotechnology* 23, 352-363.

Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., et al. (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318, 245-250.

Michaeli, S., and Galili, G. (2014). Degradation of organelles or specific organelle components via selective autophagy in plant cells. *International journal of molecular sciences* 15, 7624-7638.

Michaeli, S., Honig, A., Levanony, H., Peled-Zehavi, H., and Galili, G. (2014). Arabidopsis ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. *The Plant cell* 26, 4084-4101.

Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., and Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science signaling* 2, ra45.

Minina, E.A., Bozhkov, P.V., and Hofius, D. (2014). Autophagy as initiator or executioner of cell death. *Trends in plant science* 19, 692-697.

Minina, E.A., Sanchez-Vera, V., Moschou, P.N., Suarez, M.F., Sundberg, E., Weih, M., and Bozhkov, P.V. (2013). Autophagy mediates caloric restriction-induced lifespan extension in *Arabidopsis*. *Aging Cell* 12, 327-329.

Mintern, J.D., and Harris, J. (2015). Autophagy and immunity. *Immunology and cell biology* 93, 1-2.

Mitchell, D.R. (2000). CHLAMYDOMONAS FLAGELLA. *J. Phycol.* 36, 261-273.

Mittag, M., Kiaulehn, S., and Johnson, C.H. (2005). The circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. What is it for? What is it similar to? *Plant physiology* 137, 399-409.

Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology* 36, 2491-2502.

Mizushima, N. (2007). Autophagy: process and function. *Genes & development* 21, 2861-2873.

Mizushima, N. (2009). Methods for Monitoring Autophagy Using GFP-LC3 Transgenic Mice. In *Methods in Enzymology*, pp. 13-23.

Mizushima, N. (2014). Sugar modification inhibits autophagosome-lysosome fusion. *Nature cell biology* 16, 1132-1133.

Mochida, K., Oikawa, Y., Kimura, Y., Kirisako, H., Hirano, H., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2015). Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* 522, 359-362.

Moharikar, S., D'Souza, J.S., and Rao, B.J. (2007). A homologue of the defender against the apoptotic death gen (dad1) in UV-exposed *Chlamydomonas* cells is downregulated with the onset of programmed cell death. *J. Biosci.* 32, 261–270.

Montero, D., Tachibana, C., Rahr Winther, J., and Appenzeller-Herzog, C. (2013). Intracellular glutathione pools are heterogeneously concentrated. *Redox biology* 1, 508-513.

Moore, M.N. (2014). Autophagy as a second level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Autophagy* 4, 254-256.

Mosulen, S. (2003). Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomolecular Engineering* 20, 199-203.

Munch, D., Rodriguez, E., Bressendorff, S., Park, O.K., Hofius, D., and Petersen, M. (2014). Autophagy deficiency leads to accumulation of ubiquitinated proteins, ER stress, and cell death in *Arabidopsis*. *Autophagy* 10, 1579-1587.

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Kuraoka, A., Fukushima, K., Shibata, Y., Komiyama, S., and Nishimoto, T. (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol Cell Biol* 13, 6367-6374.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10, 458-467.

Nakka, V.P., Prakash-Babu, P., and Vemuganti, R. (2014). Crosstalk Between Endoplasmic Reticulum Stress, Oxidative Stress, and Autophagy: Potential Therapeutic Targets for Acute CNS Injuries. *Molecular neurobiology*.

Nasiadek, M., Skrzypinska-Gawrysiak, M., Darago, A., Zwierzynska, E., and Kilanowicz, A. (2014). Involvement of oxidative stress in the mechanism of cadmium-induced toxicity on rat uterus. *Environ Toxicol Pharmacol* 38, 364-373.

Navarro-Yepes, J., Burns, M., Anandhan, A., Khalimonchuk, O., del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Pappa, A., Panayiotidis, M.I., and Franco, R. (2014). Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxidants & redox signaling* 21, 66-85.

Nazio, F., Strappazon, F., Antonioli, M., Bielli, P., Cianfanelli, V., Bordi, M., Gretzmeier, C., Dengjel, J., Piacentini, M., Fimia, G.M., et al. (2013). mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nature cell biology* 15, 406-416.

Nguyen, H.M., Baudet, M., Cuine, S., Adriano, J.M., Barthe, D., Billon, E., Bruley, C., Beisson, F., Peltier, G., Ferro, M., et al. (2011). Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism. *Proteomics* 11, 4266-4273.

Niemann, A., Takatsuki, A., and Elsässer, H.-P. (2000). The Lysosomotropic Agent Monodansylcadaverine Also Acts as a Solvent Polarity Probe. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48, 251–258.

Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654-658.

Niwa, Y., Kato, T., Tabata, S., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., and Moriyasu, Y. (2004). Disposal of chloroplasts with abnormal function into the vacuole in *Arabidopsis thaliana* cotyledon cells. *Protoplasma* 223, 229-232.

Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279.

Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., Queval, G., and Foyer, C.H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* 35, 454-484.

Nomura, R., Orii, M., and Senda, T. (2011). Calreticulin-2 is localized in the lumen of the endoplasmic reticulum but is not a Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *Histochem Cell Biol* 135, 531-538.

Nordgren, M., Wang, B., Apanasets, O., and Fransen, M. (2013). Peroxisome degradation in mammals: mechanisms of action, recent advances, and perspectives. *Front Physiol* 4, 145.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., et al. (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* 26, 9220-9231.

Ohresser, M., Matagne, R.F., and Loppes, R. (1997). Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the nit1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current genetics* 31, 264-271.

Oku, M., and Sakai, Y. (2010). Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation. *FEBS J* 277, 3289-3294.

Oliveira, V.A., Oliveira, C.S., Mesquita, M., Pedroso, T.F., Costa, L.M., Fiuza Tda, L., and Pereira, M.E. (2015). Zinc and N-acetylcysteine modify mercury distribution and promote increase in hepatic metallothionein levels. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* 32, 183-188.

Onda, Y., and Kobori, Y. (2014). Differential activity of rice protein disulfide isomerase family members for disulfide bond formation and reduction. *FEBS Open Bio* 4, 730-734.

Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Blasing, O.E., Hohne, M., Gunter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W.R., et al. (2007). Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49, 463-491.

Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B., and Sekmen, A.H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65, 1377-1390.

Pagani, M., Fabbri, M., Benedetti, C., Fassio, A., Pilati, S., Bulleid, N.J., Cabibbo, A., and Sitia, R. (2000). Endoplasmic reticulum oxidoreductin 1-lbeta (ERO1-Lbeta), a human gene induced in the course of the unfolded protein response. *J Biol Chem* 275, 23685-23692.

Papácková, Z., and Cahová, M. (2014). Important Role of Autophagy in Regulation of Metabolic Processes in Health, Disease and Aging. *Physiological research* 63, 409-420.

Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C.A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., et al. (2014). Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Molecular cell* 53, 471-483.

Patsikka, E., Kairavuo, M., Sersen, F., Aro, E.M., and Tyystjarvi, E. (2002). Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. *Plant physiology* 129, 1359-1367.

- Peixoto, P.H.P., Cambraia, J., Sant'Anna, R., Mosquim, P.R., and Moreira, M.A. (2001). Aluminum Effects on Fatty Acid Composition and Lipid Peroxidation of a Purified Plasma Membrane Fraction of Root Apices of Two Sorghum Cultivars. *Journal of Plant Nutrition* 24, 1061-1070.
- Pérez--Pérez, M.E., and Crespo, J.L. (2014). Autophagy in algae Perspectives in *Phycology* 1, 93-101.
- Pérez-Pérez, M.E., Couso, I., and Crespo, J.L. (2012a). Carotenoid deficiency triggers autophagy in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* 8, 376–388.
- Pérez-Pérez, M.E., and Crespo, J.L. (2010). Autophagy in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Autophagy* 6, 562-563.
- Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L. (2010). Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 152, 1874-1888.
- Perez-Perez, M.E., Lemaire, S.D., and Crespo, J.L. (2012b). Reactive oxygen species and autophagy in plants and algae. *Plant physiology* 160, 156-164.
- Perez-Perez, M.E., Zaffagnini, M., Marchand, C.H., Crespo, J.L., and Lemaire, S.D. (2014). The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy* 10, 1953-1964.
- Pérez, M.E.P., and Crespo, J.L. (2014). Autophagy in algae Perspectives in *Phycology* 1, 93 - 101.
- Perfus-Barbeoch, L., Leonhardt, N., Vavasseur, A., and Forestier, C. (2002). Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *The Plant Journal* 32, 539–548.
- Phadwal, K., Watson, A.S., and Simon, A.K. (2013). Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 89-103.
- Pootakham, W., Gonzalez-Ballester, D., and Grossman, A.R. (2010). Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* 153, 1653-1668.
- Pourcel, L., Irani, N.G., Lu, Y., Riedl, K., Schwartz, S., and Grotewold, E. (2010). The formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions in *Arabidopsis thaliana* and implications for the sequestration of anthocyanin pigments. *Molecular plant* 3, 78-90.



Pratheesh, P.T., Vineetha, M., and Kurup, G.M. (2014). An Efficient Protocol for the Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Biotechnology* 56, 507-515.

Pu, Y., and Bassham, D.C. (2013). Links between ER stress and autophagy in plants. *Plant Signaling & Behavior* 8, e24297.

Purton, S. (2007). Tools and Techniques for Chloroplast Transformation of *Chlamydomonas*. In *Transgenic Microalgae as Green Cell Factories*, R. León, A. Galván, and E. Fernández, eds. (Landes Bioscience and Springer Science+Business Media).

Qiu, Y., Xi, J., Du, L., Roje, S., and Poovaiah, B.W. (2012). A dual regulatory role of *Arabidopsis* calreticulin-2 in plant innate immunity. *Plant J* 69, 489-500.

Queval, G., and Noctor, G. (2007). A plate reader method for the measurement of NAD, NADP, glutathione, and ascorbate in tissue extracts: Application to redox profiling during *Arabidopsis* rosette development. *Anal Biochem* 363, 58-69.

Quinn, J.M., Kropat, J., and Merchant, S. (2003). Copper Response Element and Crr1-Dependent Ni<sup>2+</sup>-Responsive Promoter for Induced, Reversible Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* 2, 995-1002.

Ramesh, V.M., Bingham, S.E., and Webber, A.N. (2011). A simple method for chloroplast transformation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Methods in molecular biology* 684, 313-320.

Ramming, T., Okumura, M., Kanemura, S., Baday, S., Birk, J., Moes, S., Spiess, M., Jenö, P., Berneche, S., Inaba, K., et al. (2015). A PDI-catalyzed thiol-disulfide switch regulates the production of hydrogen peroxide by human Ero1. *Free radical biology & medicine* 83, 361-372.

Ramundo, S., Casero, D., Muhlhaus, T., Hemme, D., Sommer, F., Crevecoeur, M., Rahire, M., Schroda, M., Rusch, J., Goodenough, U., et al. (2014). Conditional Depletion of the *Chlamydomonas* Chloroplast ClpP Protease Activates Nuclear Genes Involved in Autophagy and Plastid Protein Quality Control. *The Plant cell* 26, 2201-2222.

Raymond, J.A., and Morgan-Kiss, R. (2013). Separate Origins of Ice-Binding Proteins in Antarctic *Chlamydomonas* Species. *PLOS ONE* 8.

Ravet, K., and Pilon, M. (2013). Copper and iron homeostasis in plants: the challenges of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 19, 919-932.

Redmann, M., Dodson, M., Boyer-Guittaut, M., Darley-Usmar, V., and Zhang, J. (2014). Mitophagy mechanisms and role in human diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 53, 127-133.

Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M., and Bonnefoy, N. (2006). High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 4771-4776.

Ren, C., Liu, J., and Gong, Q. (2014). Functions of autophagy in plant carbon and nitrogen metabolism. *Frontiers in plant science* 5, 301.

Reyes, F.C., Chung, T., Holding, D., Jung, R., Vierstra, R., and Otegui, M.S. (2011). Delivery of prolamins to the protein storage vacuole in maize aleurone cells. *The Plant cell* 23, 769-784.

Rochaix, J.D. (2001). Assembly, Function, and Dynamics of the Photosynthetic Machinery in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant physiology* 127, 1394-1398.

Ruberti, C., Kim, S.J., Stefano, G., and Brandizzi, F. (2015). Unfolded protein response in plants: one master, many questions. *Current opinion in plant biology* 27, 59-66.

Russell, R.C., Yuan, H.X., and Guan, K.L. (2014). Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell research* 24, 42-57.

Sahu, G.K., Upadhyay, S., and Sahoo, B.B. (2012). Mercury induced phytotoxicity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Physiol Mol Biol Plants* 18, 21-31.

Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I.J., and Kiel, J.A. (2006). Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 1767-1775.

Sambrook, J. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4 edn (Cold Spring Harbor, New York: John Inglis).

Sampaio-Marques, B., Felgueiras, C., Silva, A., Rodrigues, F., and Ludovico, P. (2011). Yeast chronological lifespan and proteotoxic stress: is autophagy good or bad? *Biochemical Society transactions* 39, 1466-1470.

Scaife, M.A., Nguyen, G.T., Rico, J., Lambert, D., Helliwell, K.E., and Smith, A.G. (2015). Establishing *Chlamydomonas reinhardtii* as an industrial biotechnology host. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82, 532-546.

Sciarretta, S., Yee, D., Ammann, P., Nagarajan, N., Volpe, M., Frati, G., and Sadoshima, J. (2015). Role of NADPH oxidase in the regulation of autophagy in cardiomyocytes. *Clinical science* 128, 387-403.

Schatz, D., Shemi, A., Rosenwasser, S., Sabanay, H., Wolf, S.G., Ben-Dor, S., and Vardi, A. (2014). Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of a DNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytol* 204, 854-863.

Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17, 422-427.

Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci* 36, 30-38.

Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., and Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal* 26, 1749–1760.

Schmidt, A., Kunz, J., and Hall, M.N. (1996). TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13780-13785.

Schneider, E.G., Nguyen, H.T., and Lennarz, W.J. (1978). The Effect of Tunicamycin, an Inhibitor of Protein Glycosylation, on Embryonic Development in the Sea Urchin. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 253, 2348-2355.

Schneider, J.L., and Cuervo, A.M. (2014). Autophagy and human disease: emerging themes. *Current opinion in genetics & development* 26C, 16-23.

Schroda, M. (2004). The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynthesis Research* 82, 221–240.

Schroda, M. (2006). RNA silencing in *Chlamydomonas*: mechanisms and tools. *Current genetics* 49, 69-84.

Schroda, M., Beck, C.F., and Vallon, O. (2002). Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 31, 445-455.

Schroda, M., Blocker, D., and Beck, C.F. (2000). The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal* 21, 121-131.

Schuck, S., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2014). ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *J Cell Sci* 127, 4078-4088.

Seino, J., Wang, L., Harada, Y., Huang, C., Ishii, K., Mizushima, N., and Suzuki, T. (2013). Basal autophagy is required for the efficient catabolism of sialyloligosaccharides. *The Journal of biological chemistry* 288, 26898-26907.

Shemi, A., Ben-Dor, S., and Vardi, A. (2015). Elucidating the composition and conservation of the autophagy pathway in photosynthetic eukaryotes. *Autophagy* 11, 701-715.

Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., and Usuda, H. (1998). High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *Genetics* 148, 1821-1828.

Shintani, T., and Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* 306, 990-995.

Siaut, M., Cuine, S., Cagnon, C., Fessler, B., Nguyen, M., Carrier, P., Beyly, A., Beisson, F., Triantaphylides, C., Li-Beisson, Y., et al. (2011). Oil accumulation in the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: characterization, variability between common laboratory strains and relationship with starch reserves. *BMC biotechnology* 11, 7.

Simon, D.F., Domingos, R.F., Hauser, C., Hutchins, C.M., Zerges, W., and Wilkinson, K.J. (2013). Transcriptome Sequencing (RNA-seq) Analysis of the Effects of Metal Nanoparticle Exposure on the Transcriptome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4774–4785.

Simonsen, A., Cumming, R.C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D.R., and Finley, K.D. (2014). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* 4, 176-184.

Simonsen, A., and Stenmark, H. (2008). Self-eating from an ER-associated cup. *The Journal of cell biology* 182, 621-622.

Sizova, I., Fuhrmann, M., and Hegemann, P. (2001). A *Streptomyces rimosus* aphVIII gene coding for a new type phosphotransferase provides stable antibiotic resistance to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Gene* 277, 221-229.

Sodeinde, O.A., and Kindle, K.L. (1993). Homologous recombination in the nuclear genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 9199-9203.

Sommer, F., Kropat, J., Malasarn, D., Grosseohme, N.E., Chen, X., Giedroc, D.P., and Merchant, S.S. (2010). The CRR1 nutritional copper sensor in *Chlamydomonas* contains two distinct metal-responsive domains. *The Plant cell* 22, 4098-4113.

Son, Y.O., Wang, X., Hitron, J.A., Zhang, Z., Cheng, S., Budhraj, A., Ding, S., Lee, J.C., and Shi, X. (2011). Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 255, 287-296.

Sou, Y.S., Waguri, S., Iwata, J., Ueno, T., Fujimura, T., Hara, T., Sawada, N., Yamada, A., Mizushima, N., Uchiyama, Y., et al. (2008). The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Molecular biology of the cell* 19, 4762-4775.

Spalding, M.H. (2008). Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms: *Chlamydomonas* inorganic carbon transporters. *Journal of experimental botany* 59, 1463-1473.

Stern, B.R. (2010). Essentiality and toxicity in copper health risk assessment: overview, update and regulatory considerations. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 73, 114-127.

Stevens, D.R., Rochaix, J.-D., and Purton, S. (1996). The bacterial phleomycin resistance gene *ble* as a dominant selectable marker in *Chlamydomonas*. *Mol Gen Genet* 251, 23-30.

Stoiber, T.L., Shafer, M.M., and Armstrong, D.E. (2013). Induction of reactive oxygen species in *chlamydomonas reinhardtii* in response to contrasting trace metal exposures. *Environmental toxicology* 28, 516-523.

Stolz, A., Ernst, A., and Dikic, I. (2014). Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology* 16, 495-501.

Stroupe, C. (2011). Autophagy: cells SNARE selves. *Current biology : CB* 21, R697-699.

Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T., and Vierstra, R.D. (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23, 3761-3779.

Takatsuka, C., Inoue, Y., Higuchi, T., Hillmer, S., Robinson, D.G., and Moriyasu, Y. (2011). Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant & cell physiology* 52, 2074-2087.

Tam, L.-W., and Lefebvre, P.A. (1995). Chapter 74 Insertional Mutagenesis and Isolation of Tagged Genes in *Chlamydomonas*. In *Methods in Cell Biology*, D. William, and W. George, eds. (Academic Press), pp. 519-523.

Tan, Y.F., O'Toole, N., Taylor, N.L., and Millar, A.H. (2010). Divalent metal ions in plant mitochondria and their role in interactions with proteins and oxidative stress-induced damage to respiratory function. *Plant Physiol* 152, 747-761.

Tanida, I., Ueno, T., and Uchiyama, Y. (2014). A super-ecliptic, pHluorin-mKate2, tandem fluorescent protein-tagged human LC3 for the monitoring of mammalian autophagy. *PloS one* 9, e110600.

Tavassoly, I., Parmar, J., Shajahan-Haq, A.N., Clarke, R., Baumann, W.T., and Tyson, J.J. (2015). Dynamic Modeling of the Interaction Between Autophagy and Apoptosis in Mammalian Cells. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 4, 263-272.

Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., and Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Biochemistry* 29, 2466-2470.

Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A., and Vierstra, R.D. (2005). Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant physiology* 138, 2097-2110.

Thompson, A.R., and Vierstra, R.D. (2005). Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Current opinion in plant biology* 8, 165-173.

Tietze, F. (1969). Enzymatic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 27, 502-522.

Trejo-Solís, C., Jimenez-Farfan, D., Rodriguez-Enriquez, S., Fernandez-Valverde, F., Cruz-Salgado, A., Ruiz-Azuara, L., and Sotelo, J. (2012). Copper compound induces autophagy and apoptosis of glioma cells by reactive oxygen species and jnk activation. *BMC Cancer* 12.

Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS* 333, 169-174.

Tu, B.P., and Weissman, J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology* 164, 341-346.

Urzica, E.I., Adler, L.N., Page, M.D., Linster, C.L., Arbing, M.A., Casero, D., Pellegrini, M., Merchant, S.S., and Clarke, S.G. (2012). Impact of oxidative stress on ascorbate biosynthesis in *Chlamydomonas* via regulation of the VTC2 gene encoding a GDP-L-galactose phosphorylase. *J Biol Chem* 287, 14234-14245.

Uttenweiler, A., and Mayer, A. (2008). Microautophagy in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In *Methods in Molecular Biology*, vol. 445: Autophagosome and Phagosome, V. Deretic, ed. (Totowa, New Jersey: Humana Press).

Vahrenholz, C., Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B., and Michaelis, G. (1993). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Current genetics* 24, 241-247.

Valledor, L., Furuhashi, T., Recuenco-Munoz, L., Wienkoop, S., and Weckwerth, W. (2014). System-level network analysis of nitrogen starvation and recovery in *Chlamydomonas reinhardtii* reveals potential new targets for increased lipid accumulation. *Biotechnol Biofuels* 7, 171.

van Doorn, W.G., Kirasak, K., Sonong, A., Srihiran, Y., van Lent, J., and Ketsa, S. (2014). Do plastids in *Dendrobium cv. Lucky Duan* petals function similar to autophagosomes and autolysosomes? *Autophagy* 7, 584-597.

van Doorn, W.G., and Papini, A. (2013). Ultrastructure of autophagy in plant cells: a review. *Autophagy* 9, 1922-1936.

Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., and Rea, P.A. (2001). A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* 276, 20817-20820.

Vázquez, C.L., and Colombo, M.I. (2009). Assays to Assess Autophagy Induction and Fusion of Autophagic Vacuoles with a Degradative Compartment, Using Monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. In *Methods in Enzymology*, pp. 85-95.

Vergilio, C.S., Carvalho, C.E., and Melo, E.J. (2015). Mercury-induced dysfunctions in multiple organelles leading to cell death. *Toxicol In Vitro* 29, 63-71.

Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, Caporale, and Pigna, M. (2010). MOBILITY AND BIOAVAILABILITY OF HEAVY METALS AND METALLOIDS IN SOIL ENVIRONMENTS. *J. Soil. Sci. Plant Nutr.* 10, 268 - 292.

Vlahakis, A., and Powers, T. (2014). A role for TOR complex 2 signaling in promoting autophagy. *Autophagy* 10, 2085-2086.

Walter, P., and Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)* 334, 1081-1086.

Wang, J., Zhu, H., Liu, X., and Liu, Z. (2014). N-acetylcysteine protects against cadmium-induced oxidative stress in rat hepatocytes. *Journal of Veterinary Science* 15, 485.

Wang, Q., Zhu, J., Zhang, K., Jiang, C., Wang, Y., Yuan, Y., Bian, J., Liu, X., Gu, J., and Liu, Z. (2013). Induction of cytoprotective autophagy in PC-12 cells by cadmium. *Biochem Biophys Res Commun* 438, 186-192.

Wan, S., and Jiang, L. (2015). Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants. *Protoplasma*.

Wang, S., Huang, X., Sun, D., Xin, X., Pan, Q., Peng, S., Liang, Z., Luo, C., Yang, Y., Jiang, H., et al. (2012). Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates Akt signaling. *PloS one* 7, e37427.

Wang, S.H., Shih, Y.L., Ko, W.C., Wei, Y.H., and Shih, C.M. (2008). Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. *Cell Mol Life Sci* 65, 3640-3652.

Wang, S.H., Shih, Y.L., Kuo, T.C., Ko, W.C., and Shih, C.M. (2009). Cadmium toxicity toward autophagy through ROS-activated GSK-3 $\beta$  in mesangial cells. *Toxicol Sci* 108, 124-131.

- Wang, Y., Yu, B., Zhao, J., Guo, J., Li, Y., Han, S., Huang, L., Du, Y., Hong, Y., Tang, D., et al. (2013). Autophagy contributes to leaf starch degradation. *The Plant cell* 25, 1383-1399.
- Wani, W.Y., Boyer-Guittaut, M., Dodson, M., Chatham, J., Darley-USmar, V., and Zhang, J. (2015). Regulation of autophagy by protein post-translational modification. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 95, 14-25.
- Waser, M., Mesaeli, N., Spencer, C., and Michalak, M. (1997). Regulation of calreticulin gene expression by calcium. *The Journal of cell biology* 138, 547-557.
- Wei, Y.Y., Zheng, Q., Liu, Z.P., and Yang, Z.M. (2011). Regulation of tolerance of *Chlamydomonas reinhardtii* to heavy metal toxicity by heme oxygenase-1 and carbon monoxide. *Plant & cell physiology* 52, 1665-1675.
- Weiss-Magasic, C., Lustigman, B., and Lee, L.H. (1997). Effect of mercury on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 59, 828-833.
- Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C., and Wei, Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free radical biology & medicine* 65, 402-410.
- Woolhouse, H.W. (1983). Toxicity and Tolerance in the Responses of Plants to Metals. In *Physiological Plant Ecology III*, O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, and H. Ziegler, eds. (Springer Berlin Heidelberg), pp. 245-300.
- Wu, H., Chen, S., Ammar, A.B., Xu, J., Wu, Q., Pan, K., Zhang, J., and Hong, Y. (2014). Crosstalk Between Macroautophagy and Chaperone-Mediated Autophagy: Implications for the Treatment of Neurological Diseases. *Molecular neurobiology*.
- Xiong, Y., Contento, A.L., and Bassham, D.C. (2014). Disruption of Autophagy Results in Constitutive Oxidative Stress in *Arabidopsis*. *Autophagy* 3, 257-258.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., and Bassham, D.C. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 143, 291-299.
- Xu, Q., Liang, S., Kudla, J., and Luan, S. (1998). Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 15, 511-519.
- Xu, S., He, M., Zhong, M., Li, L., Lu, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Yu, Z., and Zhou, Z. (2015). The neuroprotective effects of taurine against nickel by reducing oxidative stress and maintaining mitochondrial function in cortical neurons. *Neurosci Lett* 590, 52-57.



- Yamasaki, S., Yagishita, N., Tsuchimochi, K., Nishioka, K., and Nakajima, T. (2005). Rheumatoid arthritis as a hyper-endoplasmic-reticulum-associated degradation disease. *Arthritis Res Ther* 7, 181-186.
- Yang, M., Zhang, F., Wang, F., Dong, Z., Cao, Q., and Chen, M. (2015). Characterization of a Type 1 Metallothionein Gene from the Stresses-Tolerant Plant *Ziziphus jujuba*. *International journal of molecular sciences* 16, 16750-16762.
- Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2009). An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Current topics in microbiology and immunology* 335, 1-32.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.L. (2009). Monitoring Autophagy by Electron Microscopy in Mammalian Cells. In *Methods in Enzymology*, pp. 143-164.
- Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress: A New Pathway to Induce Autophagy. *Autophagy* 3, 160-162.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy. *J Biol Chem* 281, 30299–30304.
- Yusuf, M., Fariduddin, Q., Hayat, S., and Ahmad, A. (2011). Nickel: an overview of uptake, essentiality and toxicity in plants. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 86, 1-17.
- Zaffagnini, M., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Morisse, S., Trost, P., and Lemaire, S.D. (2012). Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* 16, 567-586.
- Zagorchev, L., Seal, C.E., Kranner, I., and Odjakova, M. (2013). A Central Role for Thiols in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *International journal of molecular sciences* 14, 7405-7432.
- Zhang, K. (2010). Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. *Int J Clin Exp Med* 3, 33-40.
- Zhao, L., Dai, J., and Wu, Q. (2014). Autophagy-like processes are involved in lipid droplet degradation in *Auxenochlorella protothecoides* during the heterotrophy-autotrophy transition. *Frontiers in plant science* 5, 400.
- Zhao, Y., Xiong, X., and Sun, Y. (2011). DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(betaTrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Molecular cell* 44, 304-316.
- Zheng, G.H., Liu, C.M., Sun, J.M., Feng, Z.J., and Cheng, C. (2014). Nickel-induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratus* liver by JNK pathway. *Aquat Toxicol* 147, 105-111.

Zheng, Q., Cheng, Z.Z., and Yang, Z.M. (2013). HSN3 mediates adaptive response of *Chlamydomonas reinhardtii* to excess nickel. *Plant Cell Physiol* 54, 1951-1962.

Zhong, W., Zhu, H., Sheng, F., Tian, Y., Zhou, J., Chen, Y., Li, S., and Lin, J. (2014). Activation of the MAPK11/12/13/14 (p38 MAPK) pathway regulates the transcription of autophagy genes in response to oxidative stress induced by a novel copper complex in HeLa cells. *Autophagy* 10, 1285-1300.

Zhou, J., Yu, J.Q., and Chen, Z. (2014). The perplexing role of autophagy in plant innate immune responses. *Molecular plant pathology* 15, 637-645.